

New 2'0-alkyl-oligo-ribonucleotide(s) with 8-35 nucleotide units - useful as anti-sense oligo-nucleotide(s), primers and probes**Publication number:** DE4110085 (A1)**Publication date:** 1992-10-01**Inventor(s):** BRUNAR HELMUT DIPL ING [AT]; HOLZNER ARMIN DIPL ING [AT]; ISSAKIDES GEORG DIPL ING [AT]; KNOLLMUELLER MAX PROF DR [AT]; NOE CHRISTIAN DIPL ING DR [AT]; BIRNSTIEL MAX PROF DR [AT]; COTTEN MATTHEW DR [AT]; OBERHAUSER BERND DR [AT]; WAGNER ERNST DR [AT]; SCHAFFNER GOTTHOLD DR [AT]**Applicant(s):** BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]**Classification:****- international:** C07H19/06; C07H19/10; C07H19/16; C07H19/20; C07H21/00; C07H19/00; C07H21/00; (IPC1-7): A61K31/70; A61K49/00; C07H19/10; C07H19/20**- European:** C07H19/06E; C07H19/10E; C07H19/16E; C07H19/20; C07H21/00C2**Application number:** DE19914110085 19910327**Priority number(s):** DE19914110085 19910327**Abstract of DE 4110085 (A1)**

The following are claimed: (A) Prepn. of an oligoribonucleotide (A), based on 8-35 nucleotides of formula (II) (or a 2'-OH or 2'-deoxy deriv.) comprises: (a) linking the corresp. ribonucleotide building blocks in the presence of a coupling agent; and (b) opt. incorporating labelled gps. and/or lipophilic gps. in (A) and opt. cleaving protecting gps.. In (II), B = cytosine, uracil, adenine, guanine or inosine; R = 1-30C alkyl; E1 = a phosphate diester-, methyl phosphonate, phosphoramidate- or phosphorthioate-residue; Provided that (i) at least one R is 2-30C alkyl and (ii) the terminal 3' and 5' positions are an OH gp. (opt. modified by a labelled or lipophilic gp.) or a phosphite ester-, H-phosphonate- or phosphate ester-residue. (B) Prepn. of an oligoribonucleotide (A'), based on 8-35 nucleotides; (C) (A) are new (A") when the terminal 3' and 5' positions are OH (opt. modified by labelled or lipophilic gps.) or a phosphate ester residue; (D) Prepn. of nucleosides of formula (III) where B" = opt. protected cytosine, uracil, adenine, guanine or inosine; R" = 2-30C alkyl when B is opt. protected adenine, otherwise 1-30C. (E) (III) are new (i) when B" is guanine protected in 6-position by nitrophenylethyl and R" is methyl, and (ii) when R" is 2-30C alkyl and B" is opt. protected cytosine, inosine, uracil or guanine. (F) Alkylated ribonucleotide building blocks are new; and (G) Liposomes, in which are incorporated (A") modified by 3'cholesterol or 3'-thiocholesterol, are new. USE - (A") are useful as antisense oligonucleotides, probes, primers or primer sections. They may be used to inhibit gene expression or virus replication.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 41 10 085 A 1

(51) Int. Cl. 5:
C 07 H 19/20
C 07 H 19/10
A 61 K 31/70
A 61 K 49/00

(21) Aktenzeichen: P 41 10 085.9
(22) Anmeldetag: 27. 3. 91
(43) Offenlegungstag: 1. 10. 92

DE 41 10 085 A 1

(71) Anmelder:

Boehringer Ingelheim International GmbH, 6507
Ingelheim, DE

(72) Erfinder:

Brunar, Helmut, Dipl.-Ing., Wien, AT; Holzner, Armin,
Dipl.-Ing., Ternitz, AT; Issakides, Georg, Dipl.-Ing.;
Knollmüller, Max, Prof. Dr.; Noe, Christian, Dipl.-Ing.
Dr.; Birnstiel, Max, Prof. Dr.; Cotten, Matthew, Dr.;
Oberhauser, Bernd, Dr., Wien, AT; Wagner, Ernst,
Dr., Langenzersdorf, AT; Schaffner, Gotthold, Dr.,
Wien, AT

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) 2'-O-Alkyl-oligoribonukleotide, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als

Antisense-Oligonukleotide

(57) 2'-O-Alkyl-oligoribonukleotide, aufgebaut aus 8 bis 35
Nukleotiden der allgemeinen Formel II



worin
B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und
E¹ ein Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramido- oder Phosphorthioatrest ist,
oder deren 2'-OH oder 2'-Desoxyderivat,
wobei in mindestens einem der Nukleotide R Alkyl mit 2 bis
30 C-Atomen ist; die Bausteine, aus denen sie aufgebaut
sind, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung
als Antisense-Oligonukleotide, Sonden, Primer oder Primer-
abschnitte.

DE 41 10 085 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf 2'-O-Alkyloligonukleotide, die Bausteine, aus denen sie aufgebaut sind, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung als Antisense-Oligonukleotide, Sonden, Primer oder Primerabschnitte und ferner auf 2'-O-Alkyloligonukleotide, die an den Positionen am 3'- und 5'-Ende modifiziert sind.

Oligonukleotide binden durch spezifische Wasserstoffbrückenbindungen von Basenpaaren an komplementäre Sequenzen von genomischer DNA oder RNA, wobei bereits relativ kurze Oligomere von < 20 Basen spezifisch mit DNA oder RNA hybridisieren und auf diese Weise die Genexpression oder die virale Replikation gezielt beeinträchtigen können.

Im folgenden sind als Antisense-Substanzen Oligonukleotide definiert, die aufgrund Basensequenz-spezifischer Wechselwirkung eine inhibierende Wirkung auf bestimmte Gene ausüben können. Diese Antisense Oligonukleotide können durch Basenpaarung komplementäre einzelsträngige Nukleinsäuresequenzen (DNA oder RNA) oder auch doppelsträngige Nukleinsäuresequenzen (DNA) von Genabschnitten binden, wobei aus dieser Bindung eine Inhibition des entsprechenden Gens resultiert. Dabei kann das Antisense Oligonukleotid komplementär zu dem RNA-Strang sein ("antisense"), oder im gegebenen Falle auch die gleiche Sequenz ("sense") haben; letztere ist somit komplementär zum entsprechenden DNA-Strang der Sequenz.

Die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden als spezifische Inhibitoren der Genexpression oder der Virusreplikation, sog. "Antisenseoligonukleotide", hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen. Eine wesentliche Beschränkung bei der Anwendung dieser Strategie besteht jedoch darin, daß kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Moleküle nach ihrem Eintritt in die Zelle biologisch instabil sind. Um diesem Nachteil zu begegnen, sind bereits einige Versuche unternommen worden, nicht in der Natur vorkommende Nukleinsäure-Analoga zu synthetisieren, die bei erhöhter Biostabilität die Hemmaktivität der natürlichen Nukleinsäuren aufweisen. Ergebnisse dieser Versuche, die sich bisher vor allem auf Oligodesoxyribonukleotid-Analoga konzentriert haben, sind z. B. Phosphorthioate, Methylphosphonate und Phosphoramidate.

Da der RNA-RNA-Doppelstrang stabiler ist als das DNA-RNA-Hybrid, wurde der vorliegenden Erfindung die Aufgabenstellung auf RNA-RNA-Hybride ausgerichtet, bei denen dem Vorteil einer größeren Hybridstabilität eine größere Anfälligkeit der RNA gegenüber Nukleaseabbau gegenübersteht.

Es sind relativ wenige Beispiele für Oligoribonukleotid-Analoga bekannt, die diesen Nachteil nicht oder in geringerem Maß als die natürlichen Ribonukleotide aufweisen (dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß technische Schwierigkeiten bei der RNA-Synthese bestanden).

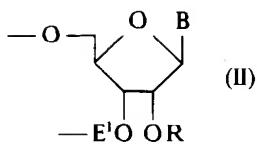
Eines dieser bekannten Beispiele ist die Modifikation der Ribose durch Anfügen einer 2'-O-Methylgruppe, von der festgestellt wurde, daß sie die Wirkung von RNA- und DNA-spezifischen Nukleasen hemmt (Sproat et al., Nucleic Acids Research, 1 (1989) 3373–3386). Ein weiteres Beispiel für 2'-O-modifizierte Oligoribonukleotide sind 2'-O-Allyl-Oligoribonukleotide, von denen gezeigt wurde, daß sie die Nukleaseresistenz der 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotide und zusätzlich eine erhöhte Bindungsfähigkeit an einen komplementären RNA-Abschnitt aufweisen. Von denselben Autoren wurden 2'-O-Dimethylallyl-Oligoribonukleotide beschrieben, die zwar Stabilität gegenüber Nukleasen, jedoch relativ geringe Bindungsaffinität zu den Zielsequenzen aufweisen (Iribarren et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990) 7747–7751).

Es ist bekannt, Oligoribonukleotide aus Ribonukleotidbausteinen mittels der Festphasenmethode herzustellen. Nach Sproat et al., Nucleic Acids Research 17, (9), (1989) 3373–3386 können zum Beispiel 2'-O-Methyloligoribonukleotide nach der Festphasenmethode aus 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methylribonukleosid-3'-O-(2-cyanoethyl N,N-diisopropyl-phosphoramiditen unter Verwendung von 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol als Aktivator hergestellt werden. Bei diesen Verfahren wird die Alkylierung nach Anbringung entsprechender Schutzgruppen in einer späteren Stufe des Gesamtverfahrens mit in der Regel schlechten Ausbeuten ausgeführt, so daß insbesondere auch durch die erforderliche Abtrennung des bei der Reaktion gebildeten 3'-O-Methyl Isomers in einer späteren Stufe große Ausbeuteverluste in Kauf genommen werden müssen.

Herkömmliche Verfahren zur Herstellung methylierter Ribonukleotidbausteine beruhen vor allem auf der Alkylierung mit Diazomethan. Wegen der ungünstigen Eigenschaften, vor allem der Explosivität dieses Alkylierungsmittels ist die Herstellung größerer Mengen an alkilierten Verbindungen auf diesem Weg kaum möglich. Als ganz besonderer weiterer Nachteil des Verfahrens ergibt sich die Tatsache, daß eine Variation des Alkylrestes kaum möglich ist. Methoden zur Herstellung von 2'-O-Methylnukleosiden unter Verwendung von Methyljodid sind ebenfalls bekannt. Zum Beispiel wird in EP 2 69 574 die Herstellung von 2'-O-Methyladenosin unter Verwendung von Methyljodid und Silberoxid beschrieben. Die Herstellung von gewissen 2'-O-Methylnukleosiden unter Verwendung von Methyljodid und Silberoxid und/oder der sterisch gehinderten starken organischen Base 2-tert.-Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphosphorin (BDDDP) wird von Brian S. Sproat et al., Nucleic Acids Research 18 (1990), 41–49 beschrieben. Diese Verfahren benötigen für die Methylierung eine große Anzahl von Reaktionsstufen, was für die Herstellung größerer Mengen sehr von Nachteil ist. J. Yano, L. S. Kan und P. O. P. TS'O, Biochim. Biophys. Acta, 629 (1980), 178–183 beschreibt die Herstellung von 2'-O-Methyladenosin durch Methyljodid in einem wasserfreien alkalischen Medium. Dieses Verfahren ist auf die Herstellung von anderen 2'-O-Alkylnukleosiden nicht ohne weiteres übertragbar.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue, 2'-O-modifizierte Oligoribonukleotide bereitzustellen, die als Antisense-Oligonukleotide verwendbar sind sowie ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von 2'-O-modifizierten Oligoribonukleotiden und von 2'-O-modifizierten Ribonukleotidbausteinen.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Oligoribonukleotide, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II,



5

worin

B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und

E¹ ein Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramidat- oder Phosphorthioatrest ist,
oder deren 2'-OH oder 2'-Desoxyderivate, wobei in mindestens einem der Nukleotide R Alkyl mit 2 bis 30
C-Atomen ist, und worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine
Hydroxylgruppe oder einen Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe
modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten. Bevorzugt sind Oligoribonukleotide, worin in dem Nukleotid der
Formel II B ungeschütztes Adenin, Cytosin, Uracil oder Guanin ist, insbesondere solche, worin R Alkyl mit 2 bis 8
(insbesondere 2 bis 4) C-Atomen, vorzugsweise Ethyl, ist.

Die genannten erfindungsgemäßen 2'-O-Alkyl-Oligoribonukleotide sind aus Nukleotiden aufgebaut, deren Zucker identisch oder verschieden voneinander sein können und deren Nukleobasen (wie das allgemein bei bekannten Oligoribonukleotiden üblich ist) verschieden sind.

Bevorzugt sind Oligoribonukleotide, die nur aus Nukleotiden der Formel II aufgebaut sind sowie Oligoribonukleotide, die vorwiegend aus Nukleotiden der Formel II aufgebaut sind und zwischen diesen Bausteinen Bausteine enthalten, die in Position 2' OH oder H aufweisen. Die Länge der erfindungsgemäßen 2'-O-Alkyl-Oligoribonukleotide richtet sich nach dem Anwendungszweck. Parameter für die Länge der Oligoribonukleotide ist die Bindungsfähigkeit an die Zielsequenz unter den jeweiligen Anwendungsbedingungen, z. B. bei Anwendung als Antisense-Oligonukleotide unter physiologischen Bedingungen oder bei Anwendung als Primer unter den spezifischen Versuchsbedingungen. Im Falle der Anwendung als Antisense Oligonukleotide bestehen diese Oligonukleotide bevorzugt aus mindestens 8 und höchstens ca. 30–35 Nukleotiden, insbesondere 8 bis 19 Nukleotiden.

Die erfindungsgemäßen Oligoribonukleotide weisen eine wesentlich stärkere Hemmwirkung auf als herkömmliche Antisense-Verbindungen und sind hinsichtlich ihrer inhibierenden Antisense-Eigenschaften den 2'-O-Methyloligoribonukleotiden zumindest ebenbürtig. Verglichen mit den bekannten 2'-O-Methyloligoribonukleotiden zeigen die erfindungsgemäßen Oligoribonukleotide erhöhte Lipophilität und erhöhte Stabilität gegenüber Nukleaseen innerhalb der Zelle, verglichen mit den bekannten 2'-O-Allyloligoribonukleotiden zeigen sie niedrigere chemische Reaktivität in biologischen Systemen. Die erwähnte erhöhte Lipophilität bewirkt bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Oligoribonukleotide als Antisense-Oligonukleotid eine verbesserte Aufnahme in die Zelle.

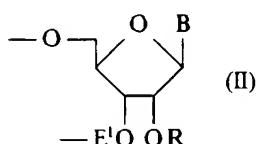
Die vorliegende Erfindung betrifft vorzugsweise neue 2'-O-Alkyl-Oligoribonukleotide, in denen Alkyl Ethyl ist und deren Verwendung als Antisense-Oligonukleotide, insbesondere zur Inhibierung der Genexpression oder der Virus-Replikation.

Die erfindungsgemäßen Oligoribonukleotide können ferner, gegebenenfalls markiert, auch als Sonden zum Nachweis spezifischer DNA oder RNA verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Oligoribonukleotide können auch als Primer bzw. Primerabschnitte bei der enzymatischen DNA-Amplifikation eingesetzt werden.

Zusätzlich zur 2'-Modifizierung können die erfindungsgemäßen 2'-modifizierten Oligoribonukleotide Modifikationen an anderen Positionen aufweisen, vorzugsweise am 3'- und/oder am 5'-Ende. Mögliche Modifikationen sind an sich bekannt; dazu zählen fluoreszierende Gruppen, Biotin oder andere prosthetische Gruppen sowie – im Hinblick auf eine höhere Affinität zu Membranen – lipophile Gruppierungen wie Thiocholesterin oder Cholesterin, Liposome, in die solche lipophile Oligoribonukleotide inkorporiert sind, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung!

Die erfindungsgemäßen 2'-O-Alkyl-Oligoribonukleotide können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Ein Verfahren zur Herstellung eines Oligoribonukleotides, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II,



55

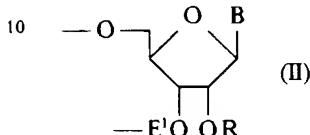
worin

B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und

E¹ ein Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramidat- oder Phosphorthioatrest ist,
oder deren 2'-OH- oder 2'-Desoxyderivate,
wobei in mindestens einem der Nukleotide R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen ist,
und worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine Hydroxylgruppe,

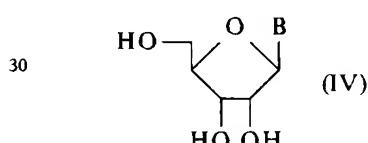
einen Phosphitester-, H-Phosphonat- oder Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß man die entsprechenden Ribonukleotidbausteine in Gegenwart eines Koplungsreagens verknüpft und gewünschtenfalls in das so erhaltenen Oligoribonukleotid markierende Gruppen und/oder lipophile Gruppen einführt und gewünschtenfalls Schutzgruppen abspaltet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines Oligoribonukleotides, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II



15 worin
B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und
E' ein Phosphatester-, Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramidat- oder Phosphorthioatrest ist,
20 oder deren 2'-OH- oder 2'-Desoxyderivate,
und worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine Hydroxylgruppe, oder einen Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die entsprechenden Ribonukleotidbausteine durch folgendes mehrstufiges Verfahren herstellt

25 a) Alkylieren eines Nukleosids der allgemeinen Formel IV,



35 worin B geschütztes oder ungeschütztes Adenin, Cytosin oder Inosin oder O⁶-geschütztes Guanin oder N³-geschütztes Uracil ist und gewünschtenfalls die Hydroxygruppe in Position 5' geschützt ist, in Gegenwart einer deprotonierenden Base mit einem Alkylierungsmittel der allgemeinen Formel V,

40 R-Z (V)

45 worin R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen ist und Z für eine nukleophile Abgangsgruppe (z. B. Halogen, Tosyl, Mesyl, Ethylsulfatrest) vorzugsweise Jod steht, umsetzt;
b) Einführen von Schutzgruppen in den Basen und der Position 5' (vorzugsweise Mono- oder Dimethoxytrityl);
c) Phosphorylieren des aus dem Reaktionsgemisch isolierten 2'-O-Alkylnukleosides durch Umsetzen mit einem Phosphorylierungsmittel, vorzugsweise Phosphoramidit;
d) Isolieren des 2'-O-Alkylnukleosid-Phosphoramidits durch Standardverfahren oder vorzugsweise durch Zusatz eines lipophilen Alkohols, vorzugsweise sec-Butanol oder iso-Propanol und Abtrennen des erwünschten 2'-O-Alkylnukleosid-Phosphoramidits durch Extraktion und Ausfällung; und
50 e) die so erhaltenen Ribonukleotidbausteine (gewünschtenfalls zusammen mit obengenannten 2'-OH und/oder 2'-H-Derivaten) nach Standardmethoden verknüpft, die Schutzgruppen abtrennt und gewünschtenfalls in das so erhaltene Oligonukleotid markierende Gruppen und/oder lipophile Gruppen einführt.
Vorzugsweise wird zur Herstellung von Guanin enthaltenden Endprodukten ein Nukleosid (IV) verwendet, in dem B O⁶-[2-(4-Nitrophenyl)ethyl]-guanin ist und gegebenenfalls zur Herstellung von Uracil enthaltenden Endprodukten ein Nukleosid (IV), in dem B N³-Cyanoethyluracil ist.

55 Gemäß der Erfindung wird die Alkylierung vorzugsweise in Gegenwart von Natriumhydrid als deprotonierender Base, unter Verwendung von R-Jodid als Alkylierungsmittel (V) bei Temperaturen bis höchstens Raumtemperatur ausgeführt wird.

Nähere Angaben zu diesen Verfahren sind in den Beispielen enthalten.

60 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von 2'-O-Alkyloligoribonukleotiden weist im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren zur Herstellung von Oligoribonukleotiden und 2'-O-Methyloligoribonukleotiden einen vereinfachten Verfahrensablauf und bessere Ausbeuten auf. Die letzte Stufe des Verfahrens, der Aufbau der Oligoribonukleotide aus den Nukleotidbausteinen erfolgt nach herkömmlichen Koplungsmethoden. Ein wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Alkylierung des Nukleosids zu dem benötigten 2'-O-Alkylnukleosid im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren in einer früheren Stufe des Verfahrens erfolgt. Die Alkylierung ist innerhalb des Gesamtverfahrens die verlustreichste Stufe, was vor allem durch die Bildung der unerwünschten Nebenprodukte (basenalkylierte Produkte, 2', 3'-O-Dialkylnukleoside und

insbesondere 3'-O-Alkylnukleosid) bedingt ist. Da erfahrungsgemäß diese Stufe zu Beginn des Gesamtverfahrens ausgeführt wird, ergibt sich eine wesentliche Verbesserung der Gesamtausbeute des Verfahrens. Durch die erfahrungsgemäße Ausführung des Alkylierungsverfahrens wird die Bildung der Nebenprodukte (besonders vorteilhaft des Nebenproduktes 3'-O-Alkylnukleosid) relativ niedrig gehalten. (In mehreren Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Anteil an 3'-O-Alkylnukleosiden nur 7—20% der Gesamtmenge der monoalkylierten (d. h. 2'-O- und 3'-O-Alkylnukleoside) Produkte beträgt.) Zudem ist bei dem erfahrungsgemäßen Verfahren die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches durch Chromatographie oder Kristallisation möglich, was eine wesentliche Vereinfachung darstellt. (Insbesondere ist die Aufarbeitung durch den geringen Anteil an 3'-O-Alkylnukleosid bedingt.)

Die Verwendung von Methyljodid für die Herstellung von 2'-O-Methyladenosin ohne Verwendung eines Katalysators wie Silberoxid ist bekannt (Yano, J., Biochim. Biophys. Acta 629 (1980), 178—183). Die Anwendung dieser Methode für die Herstellung anderer 2'-O-Methylnukleoside sowie 2'-O-Alkylnukleoside (insbesondere 2'-O-Ethylnukleoside) ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. (So ist die Reaktivität von Methyljodid wesentlich höher als die der anderen Alkyliodide. Die übrigen Nukleoside unterscheiden sich in ihrer Reaktivität wesentlich von Adenosin.) Gemäß der Erfindung wird die Alkylierung von Adenosin und Cytidin vorzugsweise an den unmodifizierten (keine Schutzgruppen enthaltende) Verbindungen ausgeführt. Somit stellt hier die Alkylierung die erste Stufe des Gesamtverfahrens dar. Die Alkylierung von Guanosin und Uridin erfolgt vorzugsweise an O⁶-geschütztem Guanosin beziehungsweise N³-geschütztem Uridin. (Die bevorzugten Schutzgruppen sind O⁶-Nitrophenylethyl beziehungsweise N³-Cyanoethyl.) Somit ist für Guanosin und Uridin die Alkylierung die zweite Stufe des Herstellungsverfahrens. Im allgemeinen sind an sich bekannte Schutzgruppen geeignet, wie sie z. B. beschrieben werden in Welch, Ch. J. et al., Acta Chem. Scand. B37 (1983), 147—150.

Wie bereits beschrieben worden ist, erfolgt das erfahrungsgemäße Alkylierungsverfahren mittels Alkyhalogenid (vorzugsweise Alkylbromid und insbesondere Alkyljodid) in Gegenwart von Natriumhydrid. Durch Alkylieren bei tiefen Temperaturen kann man die Selektivität der Alkylierung (Reduzieren der 3'-O-Alkylierung) wesentlich erhöhen, wodurch die Ausbeute an gewünschtem Produkt erhöht und die Aufarbeitbarkeit des Reaktionsgemisches wesentlich verbessert wird. Andererseits sinkt mit der Reaktionstemperatur die Reaktivität der Reaktionskomponenten. Wie in Beispielen gezeigt wird, wird die Ethylierung von Cytidin und Adenosin vorzugsweise ausgehend von 0°C der Reaktionsmischung bis Raumtemperatur ausgeführt. Hingegen wird die Ethylierung von Guanosin vorzugsweise ausgehend von —60°C bis 0°C ausgeführt und die Ethylierung von Uridin vorzugsweise ausgehend von —40°C bis Raumtemperatur.

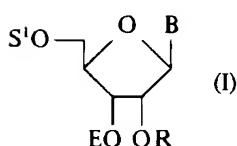
Allgemein ist festzustellen, daß die Alkylierung erfahrungsgemäß bei möglichst tiefer Temperatur ausgeführt wird, um die Selektivität der 2'-O-Alkylierung zu erhöhen.

Nach dem Alkylieren und dem Einführen der erforderlichen Schutzgruppen erfolgt das Phosphorylieren der Nukleoside nach bekannten Methoden (z. B. mit H-Phosphonat, Phosphoramidit etc.). Wenn die Phosphorylierung mit einem Phosphoramidit (vorzugsweise mit (2-Cyanoethoxy)-N,N-diisopropylmonochlorphosphoramidit) ausgeführt wird, das in Überschuß eingesetzt wird, wird gemäß der erfahrungsgemäßen Aufarbeitung zunächst ein lipphiler Alkohol (z. B. sec.-Butanol oder iso-Propanol) zugesetzt, wodurch das überschüssige Phosphorylierungsmittel zu einem lipophilen Phosphoramidit umgesetzt wird. Nach extraktiver Aufarbeitung kann dann das Nukleosid-Phosphoramidit durch Fällung isoliert werden;

das lipophile Nebenprodukt, das in einer Oligonukleotid-Synthese erheblich stören würde, bleibt dabei in Lösung und wird dadurch vollständig abgetrennt. Die Methode hat den Vorteil, daß chromatographische Aufreinigung nicht notwendig ist. Im konkreten Fall der Bausteine mit basenlabilen Phenoxyacetyl-Schutzgruppen (speziell Guanosin) ist diese Aufarbeitung besonders vorteilhaft, da die chromatographische Trennung nur erschwert möglich ist bzw. zu Produkten mit niedriger Kopplungseffizienz bei der Oligonukleotid-Synthese führt.

Von den in dem beschriebenen Verfahren verwendeten Zwischenverbindungen sind folgende Verbindungen neu und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung:

Alkylierter Ribonukleotidbaustein der allgemeinen Formel I,



worin

B ungeschütztes oder geschütztes Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,

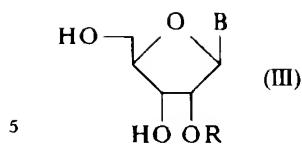
R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen bedeutet,

E ein Phosphitester-, H-Phosphonat-, Phosphatester-, Phosphatdiester- oder Phosphoramidatrest ist und

S¹ eine in der Oligonukleotidsynthese übliche Schutzgruppe bedeutet.

Bevorzugt sind Ribonukleotidbausteine der Formel I, worin B N⁶-Benzoyladenin oder N⁶-Phenoxyacetyladenin, N⁴-Benzoyl-cytosin, Uracil oder N³-Cyanoethyl-uracil, N²-Benzoyl-guanin, N²-Phenoxyacetyl-guanin oder N²-Phenoxyacetyl-O⁶-nitrophenylethyl-guanin ist, insbesondere solche Ribonukleotidbausteine, worin R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl oder n-Butyl ist und/oder E N,N-Di(1-methylethyl)methoxyphosphoramidit oder N,N-Di(1-methylethyl)-cyanoethoxyphosphoramidit ist und/oder S¹ Dimethoxytrityl oder Monomethoxytrityl ist.

Nukleosid der allgemeinen Formel III,



worin
B in Position 6 durch Nitrophenylethyl geschütztes Guanin und
10 R Methyl ist,
oder
B ungeschütztes oder geschütztes Cytosin, Inosin, Uracil oder Guanin ist und
R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen.

Diese Nukleoside können nach an sich bekanntem Verfahren hergestellt werden.
15 Bevorzugt sind Nukleoside, worin B N⁴-Benzoyl-Cytosin, N³-Cynoethyl-uracil, N²-Phenoxyacetyl-guanin oder N²-Phenoxyacetyl-O⁶-nitrophenylethyl-guanin ist und/oder R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl oder n-Butyl ist.

Zum Nachweis der biologisch hemmenden Aktivität der erfindungsgemäßen 2'-O-Ethyl-Oligoribonukleotide und der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotide wurde ein System verwendet, in dem die Hemmung der Histon-RNA-Biosynthese verfolgt werden kann:

Eine der wesentlichen Kontrollstellen in dem komplexen Syntheseweg der Histon-RNA-Biosynthese ist die Wechselwirkung des "U7 small nuclear ribonucleoprotein" (snRNP) mit der Histon-Vorläufer-mRNA (Histon-pre-mRNA). Diese Wechselwirkung ist erforderlich, um die pre-mRNA endonukleolytisch zu spalten. Diese Spaltung führt zur Entstehung der reifen mRNA, die daraufhin ins Zytoplasma transportiert wird (Birnstiel, M. L., et al. (1985) Cell 41, 349–359). Die 15–20 Nukleotide nahe dem 5'-Ende der U7-RNA enthalten zur Histon-pre-mRNA-Sequenz komplementäre Sequenzen (Strub, K., et al., (1984) EMBO J. 3, 2801–2807; Mowry, K., et al., (1987) Science 238, 1682–1687; Cotten, M., et al., (1988) EMBO J. 7, 801–808; Soldati, D. et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1518–1524). Diese Komplementaritäten sind wesentlich für das Processing (Mowry, K., et al., (1987) Science 238, 1682–1687; Cotten, M., et al., (1988) EMBO J. 7, 801–808; Soldati, D. et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1518–1524; Schaufele, F., et al. (1986) Nature 323, 777–781; Cotten, M., et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487). Weiters ist gezeigt worden, daß während des Zellzyklus die Zugänglichkeit eben dieser 5'-Nukleotide der U7 snRNP von der Zelle gemeinsam mit der DNA-Synthese moduliert wird (Hoffmann, I. et al. (1990) Nature 346, 665–668). Da das Processing der Histon-pre-mRNA durch U7 snRNP eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle der Histonbiosynthese spielt, wurde ein in-vitro-System entwickelt, um dieses Processing reproduzieren zu können (Gick, O., et al., (1986) EMBO J. 5, 1319–1326). Dieses System verwendet als Quelle für die Processing-Faktoren, in erster Linie U7 snRNP (Gick, O., et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8937–8940; Vasserot, A., et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4345–4349), einen Kernextrakt aus sich rasch teilenden Säugetierzellen. Wenn ein radioaktiv markiertes RNA-Molekül, das die Processing-Signale einer Histon-pre-mRNA enthält, diesem Extrakt hinzugefügt wird, findet eine spezifische Spaltung der pre-mRNA statt, wobei ein Molekül gebildet wird, das identisch ist mit dem in vivo gespaltenen Produkt (Gick, O., et al., (1986) EMBO J. 5, 1319–1326). Da dieses Spaltungsergebnis eine über Basenpaarung ablaufende Wechselwirkung zwischen U7 snRNP und der pre-mRNA (Schaufele, F., et al. (1986) Nature 323, 777–781) erfordert und da die Sequenz der U7 RNA bekannt ist, konnten Oligonukleotide mit Komplementarität zu pre-mRNA oder zu U7 snRNP entworfen werden, die nach Bindung zu ihrer Zielsequenz das Processing beeinträchtigen (Cotten, M., et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487). Dieses Testsystem wurde kürzlich verwendet, um die hemmende Wirkung verschiedener natürlicher RNA- und DNA-Antisensemoleküle und Ribozyme, gerichtet gegen die U7-Sequenz, zu vergleichen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde mit Hilfe dieses Test-Systems untersucht, ob die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotide und die erfindungsgemäßen 2'-O-Ethyl-Oligoribonukleotide geeignet sind, Gene spezifisch zu inhibieren. Es wurde festgestellt, daß sowohl die 2'-O-Methyl- als auch die 2'-O-Ethyl-Oligoribonukleotide den nichtmodifizierten Antisense-RNA-Molekülen bei der Hemmung des RNA-Processing um das ca. 5fache überlegen sind, wobei für die Hemmung nur ein geringer Überschuß (weniger als 5fach) das Inhibitor gegenüber der Ziel-RNA erforderlich ist, um die Processing-Reaktion zu 80% zu inhibieren. Unter Bedingungen, die die Hemmung durch ein natürliches Antisense-RNA-Molekül rückgängig machen, ist die Hemmung durch die modifizierten Antisense-Oligonukleotide praktisch irreversibel, ohne daß damit eine Modifikation der Ziel-RNA einhergeht, wie kürzlich für die Adenosindeaminase-Aktivität beschrieben (Bass, B. L., et al. (1987) Cell 48, 607–613; Bass, B. L., et al. (1988) Cell 55, 1089–1098; Rebagliati, M. R., et al. (1987) Cell 48, 599–605). Eine mögliche Erklärung für die Irreversibilität könnte im verminderter Abbau der nicht-hybridisierten 2'-O-Methyl-RNA im Extrakt gelegen sein. Die vermutete hohe Schmelztemperatur des Inhibitor/U7-Hybrids (aufgrund der größeren Länge wurde eine höhere Schmelztemperatur als die von Inoue, H., et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 6131–6148, beschriebene angenommen) und die Schwierigkeit, ausreichend Komplement zum Inhibitor hinzuzufügen, um die Inhibitor/U7-Dissociation zu bewirken, machen es beinahe unmöglich, die Bindung unter physiologischen Bedingungen rückgängig zu machen. Diese Irreversibilität spricht dafür, daß diese Klasse von Inhibitoren für in-vivo-Anwendungen geeignet ist.

Die Versuche im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden durchgeführt, um die Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren der U7-Funktion zu untersuchen. (Es war festgestellt worden, daß die 20 Nukleotide am 5'-Ende des aktiven U7 snRNP zugänglich für die Verdauung durch Mikrokokken-Nuklease sind und daß die Komple-

xierung dieser 5'-Nukleotide mit einem komplementären RNA-Nukleotid oder deren Entfernung mittels einer gekoppelten Desoxyoligo-Bindung/RNase H-Spaltung das Processing blockiert (Cotten, M., et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487; Hoffmann, I. et al. (1990) Nature 346, 665–668; Gilmartin, G., et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1076–1084). In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung war festgestellt worden, daß der — auf molarer Basis — stärkste Inhibitor der Reaktion ein Antisense-RNA-Molekül mit Komplementarität zu 61 der 63 Nukleotide der U7-Sequenz war und daß die Beschränkung für die Funktion der Antisense-Inhibitoren hauptsächlich in deren raschem Abbau in den nukleasreichen Extrakten gelegen war, die in den Versuchen verwendet wurden. Es zeigte sich, daß ein nach dem erfundungsgemäßen Verfahren erhaltenes, 19 Nukleotide großes 2'-O-Methyl-Oligoribonukleotid der 61mer-RNA überlegen ist. Weiters zeigte sich, daß das 2'-O-Methyl-19mer einem Phosphorthioat-DNA-19mer in der Hemmung der Processing-Reaktion beträchtlich überlegen ist, woraus gefolgt wurde, daß die Nuklease-Beständigkeit für die Wirksamkeit der Inhibierung nicht der einzige ausschlaggebende Faktor ist.

Beispiel 1

Hemmung einer natürlichen 63mer-Antisense-RNA im Vergleich mit einer 2'-O-Methyl-7U-19mer-Antisense-RNA

Die Reaktion zur Hemmung der Processing-Reaktion in diesem und in den folgenden Beispielen wurde durchgeführt, wie bei Cotten, M., Schaffner, G. und Birnstiel, M. L. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487, beschrieben: Ein 15 @ 1 bzw. 7,5 @ 1 Aliquot Kernextrakt (in Puffer D: 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20% Glycerin, 20 mM HEPES, pH 7,4) aus einer Maus-Hybridom-Zelllinie, enthaltend ca. 10 bzw. 20 fmol U7-RNA (Dignam, J., Lebovitz, R. und Roeder, R. (1983) Nucl. Acids Res. 11, 1475–1489; Gick, O. Krämer, A., Keller, W. und Birnstiel, M. L. (1986) EMBO J. 5, 1319–1326), wurde mit dem jeweiligen Test-Oligonukleotid in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ (in einem Volumen von 15 @ l) 30 min auf Eis, 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 30°C präinkubiert. Danach wurden 15 @ 1 einer Reaktionsmischung, enthaltend tRNA, RNasin, EDTA (Endkonzentrationen 0,17 mg/ml, 400 Einheiten/ml bzw. 20 mM) und ca. 10 fmol (10 000 CPM) einer ³²P-markierten Histon-pre-mRNA der Probe hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h lang bei 30°C reagieren gelassen, daraufhin wurden Proteinase K (auf 0,5 mg/ml) und SDS (0,5%) hinzugefügt und die Proben bei 37°C 30 min inkubiert. Die RNA aus der Probe wurde daraufhin mit Phenol/Chloroform behandelt, mit Ethanol gefällt, in 80% Formamid/0,5 × TBE plus 0,025% Bromphenolblau & 0,025% Xylylcyanol gelöst und auf einem vorgeheizten 10,7% Acrylamid/8,3 M Harnstoff/TBE-Gel aufgetrennt. Das erhaltene radioaktive Muster wurde durch Belichten eines Röntgenfilms bei –70°C sichtbar gemacht.

Die in den Versuchen verwendeten Sequenzen sind in Fig. 1 dargestellt. Die U7-Sequenz und die Maus-Histon H4-pre-mRNA sind in Cotten, M., Schaffner, G. und Birnstiel, M. L. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487, beschrieben (Die U7-RNA funktioniert wahrscheinlich aufgrund einer Basenpaarung-Wechselwirkung mit dem purinreichen Element in der pre-mRNA, das in Fig. 1 gekennzeichnet ist). Weiters sind in Fig. 1 die Sequenzen des 7U-19mer (als 2'-O-Methyl- und 2'-O-Ethyl-RNA) und des DNA-18mer, das Kontroll-2'-O-Methyl-Oligonukleotid NS19mer (ohne Komplementarität zu U7) und das Antisense-U7-RNA-63mer (die zusätzlichen Vektorsequenzen sind eingerahmt) dargestellt (Antisense-U7-RNA (7U) wurde durch in vitro T7 Polymerase-Transkription eines Derivats von pTZ19 (Pharmacia) mit einem Maus-U7-Insert, erhalten aus synthetischen DNA-Oligonukleotiden, synthetisiert).

Um zu untersuchen, ob ein 2'-O-Methyl-RNA-Molekül inhibierende Eigenschaften besitzt, wurde zunächst die Inhibition des Processing durch ein 19 Nukleotid-2'-O-Methyl-RNA-Molekül (im folgenden als 2'-O-Methyl-7U-19mer bezeichnet) mit einem auf natürlichem Weg synthetisierten RNA-Molekül, enthaltend die zu 61 Nukleotiden der U7-RNA komplementäre Sequenz, verglichen (diese komplementäre Sequenz wird als 7U-RNA bezeichnet). (In Vorversuchen war festgestellt worden, daß die 63mer-Antisense-RNA der stärkste Inhibitor des in vitro Processing war, wobei dieses Molekül bei 30fachem molarem Überschuß über die U7-RNA die Reaktion vollständig blockierte (Cotten, M., Schaffner, G. und Birnstiel, M. L. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487). Entsprechend ergab der Inhibitionstest, dessen Ergebnisse in Fig. 3 dargestellt sind, daß die Gegenwart von 300 fmol 7U-63merRNA ca. 95% der Processing-Aktivität blockiert und daß 30 fmol eine partielle Verringerung der Processing-Aktivität ergeben (Spuren 4 und 5). Im Vergleich dazu ergab das 2'-O-Methyl-7U-19mer bei 300 fmol eine vollständige Inhibition und bei 30 fmol eine Inhibition von ca. 80% (Spuren 8 und 9). Als Kontrolle wurde das 2'-O-Methyl-7U-19mer mit einem 10fachen Überschuß von U7-RNA prähybridisiert, bevor es dem Kernextrakt zugegeben wurde. Diese Vorgangsweise ergab eine totale Blockierung der Inhibition (Spur 12), welche mit 300 fmol von 2'-O-Methyl-7U-19mer allein vollständig war (Spur 9). Diese Ergebnisse zeigen, daß der 2'-O-Methyl-Inhibitor über Hybridisierung mit der Ziel-RNA via Basenpaarung funktioniert und daß die Inhibition nicht auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist. (Wenn das Komplement zum Inhibitor nach der Präinkubation des Inhibitors mit dem Extrakt zugesetzt wird, kann die durch Antisense-RNA bewirkte Hemmung rückgängig gemacht werden; Cotten, M., Schaffner, G. und Birnstiel, M. L. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487. Die Durchführung desselben Experiments mit dem 2'-O-Methyl-Inhibitor ergab, daß nur ein kleiner Anteil der Hemmung rückgängig gemacht werden konnte (Spur 13)).

Fig. 3:

Spur 1: nicht-reagiertes Substrat
Spur 2: Kontroll-Processing
Spuren 3 bis 6:

DE 41 10 085 A1

Processing nach einer Präinkubation mit 3, 30, 300, 3000 fmol 7U-63merRNA

Spuren 7 bis 11:

Processing nach Präinkubation mit 3, 30, 300, 3000 oder 30 000 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer

Spur 12:

5 300 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer wurden mit 3 pmol U7-RNA (in Puffer D) vor Zugabe zum Kernextrakt präinkubiert

Spur 13:

Der Kernextrakt wurde mit 300 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer präinkubiert. Danach wurden 3 pmol U7-RNA zur Reaktion hinzugefügt

10 Spur 14:

Kontroll-Processing (Die Zugabe von 3 pmol U7-RNA hat keinen Einfluß auf die Processing-Reaktion)

Spuren M:

Molekulargewichtsstandards: HpaII-geschnittenes pBr322 (32 P-markiert mit Hilfe des Klenow-Fragments der Polymerase I und @- 32 P-dCTP), wobei die Größe einiger der Fragmente links von der Figur angegeben ist. Die Abkürzungen "sub." und "proc." zeigen die Positionen des pre-mRNA-Substrats und des prozessierten Produkts an.

Beispiel 2

20 Hemmwirkung eines Phosphorthioat-Antisense-DNA-19mer im Vergleich mit einem
2'-O-Methyl-7U-Antisense-RNA-19mer

Bei der Durchführung dieses Beispiels wurde von folgender Überlegung ausgegangen: Wenn die einzige Determinante für die verstärkte Inhibition durch das 2'-O-Methyl-RNA-Molekül die Stabilität gegen Nukleasen ist, dann sollte die Verwendung eines Phosphorthioat-Derivats des 7U-19mer-Oligonukleotids ebenfalls eine verstärkte Fähigkeit zur Inhibition zeigen (mit der erhöhten Nukleasebeständigkeit geht jedoch eine verringernde Bindungsaffinität zur Komplementärsequenz einher (Zon, 1988, Pharm. Res. 5, 539–549)). Der Versuch wurde durchgeführt, wie in Beispiel 1 angegeben; die Ergebnisse sind in Fig. 4 dargestellt. Bezüglich des 2'-O-Methyl-7U-19mer wurden identische Ergebnisse wie in Beispiel 1 gefunden (Spalten 4–7). Als Kontrolle wurde ein Nonsense-2'-O-Methyl-Oligonukleotid, ein 19mer ohne zu U7 komplementäre Sequenzen, verwendet. Dieses Oligonukleotid (NS19mer) hat keinen Einfluß auf das Processing, wenn 3 pmol der Reaktion hinzugefügt werden (Spur 8). Wenn das Phosphorthioat-DNA-7U-19mer in diesem System getestet wird, zeigt sich, daß bei 300 fmol eine geringe Inhibition der Reaktion und bei 3 pmol ca. 30% Inhibition stattfindet (Spuren 9–13).

35 **Fig. 4:**

Spur 1: nicht-reagiertes Substrat

Spur 2: Kontroll-Processing

Spur 3: Processing nach Vorbehandlung mit Magnesium

40 Spuren 4–7:

Processing nach Präinkubation mit 3, 30, 300 oder 3000 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer

Spur 8:

Processing nach Präinkubation mit 3 pmol eines Kontroll-2'-O-Methyl-19mer

45 Spuren 9–13:

Processing nach einer Präinkubation mit 0,3, 3, 30, 300, 3000 fmol Phosphorthioat-DNA-7U-19mer

Spur 14: Kontroll-Processing

Spur M: Molekulargewichtsstandards wie in Fig. 3

Beispiel 3

50 Hemmwirkung eines 2'-O-Ethyl-7U-19mer im Vergleich mit einem Nitrophenylethyl-G-blockierten
2'-O-Ethyl-7U-19mer

Den im Rahmen dieses Beispiels durchgeführten Versuchen lag folgende Überlegung zugrunde: Guanin-Gruppen, die mit Nitrophenylethyl (NPE) modifiziert sind, haben die Fähigkeit verloren, G-C-Basenpaare zu bilden. Da im 7U-19mer die G-Reste über die Sequenz verteilt sind (Fig. 1), sollte die Gegenwart von NPE-modifizierten G-Resten die Hybridisierung des Inhibitors zur U7-Zielsequenz und damit die Inhibition blockieren. NPE-G-blockiertes 2'-O-Ethyl-7U-19mer wurde somit als Kontrolle für die Spezifität der Inhibition herangezogen. (Es wurde das in einem weiter unten beschriebenen Beispiel vor der Entfernung der NPE-Schutzgruppen als Zwischenprodukt erhaltene NPE-G-blockierte 2'-O-Ethyl-7U-19mer verwendet.) Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 5 dargestellt: das 2'-O-Ethyl-7U-19mer die Prozessierungsreaktion inhibierte bei 300 fmol komplett und bei 30 fmol zu >95%. Diese Hemmaktivität ist ähnlich der für 2'-O-Methyl-Verbindungen beobachteten (vgl. Fig. 3). Im Gegensatz dazu wies das NPE-G-blockierte 2'-O-Ethyl-7U-19mer nicht einmal bei den höchsten Konzentrationen, die untersucht wurden (3 pmol; Fig. 5), Hemmaktivität auf. Daraus ergibt sich die Bedeutung der Guanosin-Basenpaarung für die Inhibition.

65 **Fig. 5:**

Spur 1: nicht-reagiertes Substrat	
Spur 2: Kontroll-Processing	
Spur 3: Processing nach Vorbehandlung mit Magnesium	
Spuren 4–7:	
Processing nach Präinkubation mit 3, 30, 300 oder 3000 fmol 2'-O-Ethyl-7U-19mer	5
Spuren 8–11:	
Processing nach Präinkubation mit 3, 30, 300 oder 3000 fmol ^{NPE} G-2'-O-Ethyl-7U-19mer	
Spuren M:	
Molekulargewichtsstandards wie in Fig. 3	10

Beispiel 4

Hemmung eines 2'-O-Methyl-7U-19mer im Vergleich mit einem 2'-O-Ethyl-7U-19mer

In diesem Versuch wurde die Kernextraktkonzentration auf 7,5 @1 verringert, um eine empfindlichere Analyse der Processing-Reaktion durchführen zu können. Das Ergebnis der durchgeführten Versuche ist in Fig. 6 dargestellt. Wenn die beiden Inhibitoren bei Konzentrationen von 3, 9, 30, 90 und 300 fmol untersucht wurden, wurde praktisch identische Hemmaktivität festgestellt (Spuren 3–12). Um die Hemmaktivität in Abwesenheit von Magnesium zu untersuchen, wurde der Test geringfügig abgewandelt. Wenn die beiden Inhibitoren in Abwesenheit des 2wertigen Kations direkt dem Extrakt hinzugefügt wurden und die Processing-Substrat-RNA daraufhin rasch in Gegenwart von 20 mM EDTA hinzugefügt wurde, wurde eine geringfügig höhere Aktivität des 2'-O-Ethyl-Inhibitors festgestellt (vgl. die Spuren 13 und 14). Beide Inhibitoren zeigten eine Steigerung ihrer Aktivität 30 fmol, wenn sie mit dem Extrakt plus Magnesium präinkubiert wurden (vgl. Spuren 5 und 13 für 2'-O-Methyl und Spuren 10 und 14 für 2'-O-Ethyl).

Fig. 6:

Spur 1: Kontroll-Processing	
Spur 2: Processing nach Vorbehandlung mit Magnesium	
Spuren 3–7:	
Processing nach Präinkubation mit 3, 9, 30, 90 oder 300 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer	30
Spuren 8–12:	
Processing nach Präinkubation mit 3, 9, 30, 90 oder 300 fmol 2'-O-Ethyl-7U-19mer	
Spur 13:	
Processing nach Zugabe von 30 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer ohne Vorbehandlung mit Magnesium	35
Spur 14:	
Processing nach Zugabe von 30 fmol 2'-O-Ethyl-7U-19mer ohne Magnesium-Vorbehandlung	
Spur 15: Kontroll-Processing	
Spuren M:	
Molekulargewichtsstandards wie in Fig. 3	40

Beispiel 5

Bestimmung der U7-RNA-Konzentrationen in Kernextrakten vor und nach Behandlung mit Antisense-Inhibitor

Es besteht die Möglichkeit, daß in Gegenwart von Magnesium sowohl die 2'-O-Ethyl- als auch die 2'-O-Methyl-Oligonukleotide eine Modifikation (oder Zerstörung) der U7-Zielsequenz auslösen, die zur inhibierenden Wirkung beiträgt, was gegebenenfalls für die Irreversibilität der 2'-O-Methyl-Inhibition (Fig. 3) eine Rolle spielt. Obwohl nicht erwartet wurde, daß der RNA-RNA-ähnliche Doppelstrang im 2'-O-Methyl- oder -Ethyl-U7-Hybrid ein Substrat für den enzymatischen Abbau von U7 darstellt (wie das DNA-RNA-Hybrid für RNase H), wurde festgestellt, daß die Präinkubation der beiden Inhibitoren mit Kernextrakten in Gegenwart von 5 mM Mg²⁺ zu einer verstärkten Inhibition und, im Fall von 2'-O-Methyl-RNA, zur Irreversibilität (Fig. 3 und 6) führt. Um zu untersuchen, ob eine Modifikation der U7-RNA stattgefunden hat, die deren Fähigkeit, Basenpaarwechselwirkungen zu bilden, beeinträchtigt, wurde ein empfindlicher RNase-Protection-Assay verwendet. Damit wurden die Menge von U7 und seine Fähigkeit zu hybridisieren vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Oligonukleotid-Inhibitoren bestimmt. Nach Inkubation mit den verschiedenen Inhibitoren wurde, in Gegenwart von 5 mM Mg²⁺ oder ohne Magnesium, die EDTA-Konzentration auf 20 mM erhöht.

Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Die Kernextraktproben (7,5 @1) wurden in Puffer D 7,5/11,5 (Puffer D, verdünnt um einen Faktor 7,5/11,5), enthaltend die in Fig. 7 angegebenen Mengen der Oligoribonukleotide ssDNA-7U-18mer, 2'-O-Ethyl- oder 2'-O-Methyl-7U-19mer oder 2'-O-Methyl-NS-19mer, inkubiert. Die Proben, die mit "Mg²⁺" gekennzeichnet sind (4, 10–14, 16), enthielten 5 mM MgCl₂ und wurden 30 min auf Eis, 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 30°C inkubiert, worauf 20 mM EDTA hinzugefügt wurden. Bei den übrigen Proben (3, 5–9, 15) wurde die Probe in Puffer D 7,5/11,5 (mit einem Gehalt von 0,13 mM EDTA und ohne zweiwertige Kationen) 20 min auf Eis inkubiert, worauf 20 mM EDTA hinzugefügt wurden. Das Mapping wurde mit einer Antisense-Maus-U7-RNA durchgeführt, wie bei Cotten, M., Schaffner, G. und Birnstiel, M. L. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 4479–4487, beschrieben. Das Protein in der Probe wurde durch Proteinase K Verdau zerstört, die RNA geerntet und mit radioaktiver 7U-RNA hybridisiert. Anschließend wurde die Probe mit RNase A plus RNase T1 behandelt, um die gesamte nicht-doppelsträngige RNA zu zerstören, und die geschützte RNA

durch Gelelektrophorese aufgetrennt (**Fig. 7**): Die Kontrolle, unbehandelte Kernextraktproben, ergaben die für intakte U7-RNA erwartete Bande (Spuren 3 und 17). Aus der Messung der Radioaktivität dieser Bande konnte gefolgert werden, daß 7,5 @l dieses Kernextraktes ca. 10–15 fmol U7-RNA enthielten. Inkubation des Extraktes mit Mg²⁺ allein bewirkte eine geringfügige Verringerung der U7-Menge sowie das Erscheinen einer geringen Menge eines U7-Subfragments (**Fig. 7**, Spur 4). U7-Zerstörung in geringem Ausmaß tritt mit dem DNA-7U-19mer in Abwesenheit von Mg²⁺ (Spur 5) ein. Die Zerstörung von U7 ist vollständig, wenn die Probe mit 5 mM Mg²⁺ inkubiert wird (Spur 10). Jedoch wurde – in Abwesenheit und in Gegenwart von Mg²⁺ – weder mit 2'-O-Methyl-7U-19mer noch mit 2'-O-Ethyl-7U-19mer des Kontroll-2'-O-Methyl-NS19mer eine nachweisbare Änderung der U7-RNA-Menge festgestellt. Die verwendeten Bedingungen waren dieselben, die für die 7U-19mer-Oligonukleotide vollständige Inhibierung des Histon-Processing hervorriefen (**Fig. 6**). Die schwache Verringerung in den U7-Konzentrationen und das Erscheinen des U7-Subfragments in den Spuren 11–14 sind nicht ausgeprägter als die Änderungen, die mit Mg²⁺-Inkubation in Abwesenheit von Oligonukleotid beobachtet wurden (Spur 4). Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs konnte geschlossen werden, daß die starke inhibitorische Aktivität der 2'-O-Methyl- und Ethyl-Oligoribonukleotide nicht von einer enzymatischen Veränderung der Ziel-RNA begleitet ist.

Fig. 7:

- Spur 1: 7U Sonde
- Spur 2: 7U, hybridisiert mit 20 @g tRNA
- Spuren 3 und 17: Kontrolle: Extrakt, behandelt ohne Oligonukleotid, ohne Mg²⁺
- Spur 4: Extrakt, behandelt mit Mg²⁺
- Spur 5: Extrakt, behandelt mit 30 pmol ssDNA-7U-19mer
- Spuren 5 und 7: Extrakt, behandelt mit 30 und 300 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer
- Spuren 8 und 9: Extrakt, behandelt mit 30 und 300 fmol 2'-O-Ethyl-7U-19mer
- Spur 10: Extrakt, behandelt mit 30 pmol ssDNA-7U-19mer plus Mg²⁺
- Spuren 11 und 12: Extrakt, behandelt mit 30 und 300 fmol 2'-O-Methyl-7U-19mer plus Mg²⁺
- Spuren 13 und 14: Extrakt, behandelt mit 30 und 300 fmol 2'-O-Ethyl-7U-19mer plus Mg²⁺
- Spur 15: Extrakt, behandelt mit 3 pmol Kontroll-2'-O-Methyl NS-19mer
- Spur 16: Extrakt, behandelt mit 3 pmol Kontroll-2'-O-Methyl NS-19mer plus Mg²⁺
- Spuren M: Molekulargewichtsstandards wie in **Fig. 3**.

Die verkürzten U7-Spezies, die durch NA-Oligonukleotid/RNase H Spaltung gebildet wurden, sind angegeben.

- Die folgenden Beispiele erläutern einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- Die Synthese der Oligodeoxynukleotide kann nach Standardverfahren auf den ABI 380 B DNA-Synthesizer erfolgen (Applied Biosystems, 380 B DNA synthesizer, users manual, Version 1.0, Juli 1985). Das Oligodeoxynukleotid wird durch Ausfällen durch Ethanol und denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese oder Reverse Phase-HPLC gereinigt.
- Die 19mer 2'-Methoxyoligonukleotide können mit einem ABI 380 B DNA-Synthesizer synthetisiert werden, wobei CPG-Festphase (controlles-pore glass) mit einem 3'-Deoxynukleosid als Starter verwendet wird.
- Vorzugsweise werden 2'-O-Methylnukleosid(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidite mit folgenden Schutzgruppen verwendet:

- Adenosin:
N⁶-Phenoxyacetyl 5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)
- Cytidin:
N⁴-Benzoyl 5'-O-MMTr (Monomethoxytrityl)
- Guanosin: N²-Phenoxyacetyl 5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)
- Uridin:
5'-O-MMTr (Monoethoxytrityl)

Die Herstellung dieser Verbindungen ist in den Beispielen beschrieben. Das Standard-DNA-Verfahren wird dabei mit verlängerter Kopplungszeit (5 Min. anstelle von 3 Min.) verwendet. Das Oligonukleotid wird nach der Festphasensynthese durch die Behandlung mit 25%iger wässriger NH₄OH-Lösung (z. B. 15 Stunden bei 55°C) von den Schutzgruppen befreit und von dem festen Träger getrennt. Die Abspaltung der NPE-Gruppe am Guanosin (falls vorhanden) erfolgt mit DBU. Nach der abschließenden Detritylation wird das rohe Oligonukleotid durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt. Für die U7-Hemmung wird das Material weiter durch RP-HPLC (reverse phase-HPLC) gereinigt (**Fig. 2**).

Die Synthese der Phosphorthioatoligodeoxynukleotide kann durch die H-Phosphonatmethode mit einem AB 380 B DNA-Synthesizer, mit den empfohlenen Verfahren erfolgen. (Applied Biosystems, User Bulletin DNA synthesizer model 380, Issue No. 44, Dec. 1987. Froehler, B. C. and Matteucci, M. D. (1986) Tetrahedron Lett. 27, 469–72 und (1986) Nucl. Acids Res. 14, 5399–5407. Die Schwefelung kann mit Schwefel (5% in Schwefelkohlenstoff, Pyridin, Triethylamin 12 : 12 : 1) an dem festen Trägermaterial erfolgen, wobei die 5'-Endgruppe geschützt ist. Nach dem Abtrennen von dem festen Trägermaterial und dem Entfernen der Schutzgruppen der Basen, wird das 5'-Tritylphosphorothioatoligonukleotid durch RP-HPLC (reverse phase-HPLC) gereinigt. Das Material des Haupt-Peaks wird detrityliert und nochmals durch RP-HPLC (reverse phase-HPLC) gereinigt.

Die Synthese der Phosphorthioat-2'-O-Alkyloligoribonukleotide kann auch durch die Phosphoramiditmetho-

de analog dem Standardverfahren (Applied Biosystem, 380B DNA Synthesizer, users manual, Version 1.0, Juli 1985) mit 2'-O-Alkylnukleosiden erfolgen mit der Abänderung, daß im Oxidationsschritt statt Jod eine 0,2 M Lösung von 3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid in Acetonitril eingesetzt wird, wie in IYER, R. P. J. Am. Chem. Soc. 112 (1990), 1253 – 1254 beschrieben ist.

Die Synthese der 2'-O-Ethyloligonukleotide kann z. B. an einem Pharmacia Gene Assembler erfolgen, der mit 0,2 µmol festem Trägermaterial (5 µm Polymerkörner auf Basis Polystyrol) mit Deoxythymidin als 3'-Starter-nukleotid beladen ist. 5

Vorzugsweise werden 2'-O-Ethylnukleosid(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidite mit folgenden Schutzgruppen verwendet:

10

Adenosin:

N⁶-Phenoxyacetyl 5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)

Cytidin:

N⁴-Benzoyl 5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)

15

Guanosin: N²-Phenoxyacetyl

15

O⁶-NPE (NPE: 2-(4-Nitrophenyl)-ethyl)

20

5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)

20

Uridin:

5'-O-DMTr (Dimethoxytrityl)

25

Die Bedingungen entsprechen dem Standard der DNA-Synthese, ausgenommen die Kopplungsdauer, die zweckmäßig auf 5 Minuten erhöht wird. (Ablauf: Entfernen der Schutzgruppen: 0,4 Min, 3% Trichloressigsäure in Dichlorethan, Koppeln: 5,0 Min, 25 Äquivalente Amidit, 500 Äquivalente Tetranol in Acetonitril; Capping: 0,4 Minuten, 10% Essigsäureanhydrid, 3% 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (DMAP), 15% Collidin in Acetonitril; Oxidation: 0,1 Min, 0,01 M₂, 5% Collidin in Acetonitril). Diese Maßnahmen sind nötig, um der reduzierten Kopplungseffizienz entgegenzuwirken, die durch die sterische Hinderung durch die sperrige 3'-Ethoxygruppe bedingt ist. Die durchschnittliche Kopplungseffizienz ist etwa 98,3% (berechnet aus der beim Entfernen der Schutzgruppen freigesetzten Menge an Tritylkationen). Entfernen der Schutzgruppen der Base und Reinigung: Nach dem letzten De-tritylieren wird das gebundene Oligonukleotid mit 25%igem wässerigen Ammoniak während 2 Stunden bei 55°C behandelt, um es vom Träger zu trennen und alle Schutzgruppen (außer der O⁶-2-(4-Nitrophenyl)ethylgruppe (NPE) bei Guanosin) zu entfernen. Die Lösung wird im Vakuum zur Trockene gedampft und ein Teil des rohen Oligonukleotids (oder NPE-geschützten Guanosins) wird durch RP-HPLC (reverse phase-HPLC) gereinigt (Fig. 2) um als Negativkontrolle in den Hemmstudien verwendet zu werden. Bei der Herstellung von Guanosinverbindungen wird, um die NPE-Gruppe zu entfernen, das Oligonukleotid für 24 Stunden mit 500 µl von 1 M DBU (1,8-Diazabicyclo [5,4,0]undec-7-ene) in Pyridin bei 55°C behandelt. (Mag, M. and Engels, J. W. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 3525 – 3543). Nach dem Neutralisieren des DBU mit 1,1 Äquivalenten Essigsäure und teilweisem Eindampfen im Vakuum, wird die gelbe Lösung einer Gelfiltration unterworfen und das Produkt weiter gereinigt durch präparative Polyacrylamideelektrophorese. Die Ausbeute an gereinigtem 19mer: 240 µg (36 pmol, 18% bezogen auf das feste Trägermaterial, RP-HPLC Profil, Fig. 2).

30

35

40

Die anderen Oligonukleotide der Erfahrung können analog der obigen Anleitung hergestellt werden.

Beispiele für die Herstellung von Nukleosiden

N⁴-Benzoyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-methyl-cytidin 3a

45

40 g (0,164 mol) Cytidin wurden 20 Stunden bei 80°C am Hochvakuum getrocknet und hierauf in 650 ml wasserfreiem Dimethylformamid unter Erwärmung gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und mit 4,33 g (0,18 mol) gewaschenem Natriumhydrid versetzt und 45 Minuten bei 0°C gerührt. Dann wurden portionsweise, über einen Zeitraum von 4 Stunden und unter Erwärmung auf Raumtemperatur insgesamt 36,9 g (0,26 mol) Methyljodid (20%ig in Dimethylformamid) zugetropft. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und zu dem Zeitpunkt abgebrochen, als der Anteil an dimethyliertem Produkt im Reaktionsgemisch stark anstieg. Bei der Aufarbeitung wurde ausgefallenes Natriumjodid abgetrennt und das Reaktionsgemisch am Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie gereinigt (Substanz/Kieselgel = 1/10, Eluens: Chloroform/Methanol = 5/1). Rohausbeute: 22,2 g (Gemisch der 2'- und 3'-O-Methyl Isomeren, mit Natriumjodid verunreinigt; DC: Chloroform/Methanol = 3/2. R_f = 0,3 für beide Isomere). 20,8 g des Rohproduktes wurden mehrmals mit Benzol/Pyridin abgeschleppt und in 250 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Hierauf wurden bei Raumtemperatur 34,9 g (0,32 mol) Trimethylchlorsilan zugetropft und 60 Minuten gerührt. Anschließend wurden 13,5 g (0,096 mol) Benzoylchlorid zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml Wasser gegossen, mit 300 ml Methanol verdünnt und mit 250 ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Nach 20 Minuten wurde auf Dichlormethan geschüttet und die wäßrige Phase zehnmal mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Es wurden 32 g Rohprodukt 2a/5a = 4,26/1 erhalten (DC: Dichlormethan/Methanol = 10/1. R_f = 0,2, beide Regioisomere). Das Gemisch 2a/5a wurde dreimal mit Pyridin/Benzol abgeschleppt, in wasserfreiem Pyridin mit 33 g (0,0976 mol) Dimethoxytritylchlorid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und zwischen Dichlormethan und Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt. Die wäßrige Phase wurde mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (1200 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan dann Dichlorme-

50

55

60

65

70

75

80

85

than/Aceton = 8/1)) gereinigt. Es wurden 25,3 g (25%) 3a und 5,1 g (5%) 6a als gelbe feste Öle erhalten (ausgehend von Cytidin). DC: Dichlormethan/Aceton = 3,5/1,5. R_f = 0,28 für 3a, R_f = 0,24 für 6a.

¹H-NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ = 8,58 (d, J = 7,2 Hz, 1H; 6—H), 7,98—7,18 (m, 16H; DMTr, Bz, NH, 5—H), 6,89 (d, J = 7,5 Hz, 4H; DMTr), 6,02 (s, 1H; 1'—H), 4,65—3,92 (m, 4H; 2'—H, 3'—H, 4'—H, 3'—OH), 3,82 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,7 (s, 3H); 2'—OCH₃), 3,6 (m, 2H; 5'—CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 166,22 (s, C=O), 162,36 (s, 4—C*), 158,25 (s, arom., C—OCH₃), 154,37 (s, 2—C), 144,58 (d, 6—C), 143,73/135,29 (2 s, DMTr), 134,98/132,7/132,54 (arom., Bz), 129,74/129,62/128,38/127,90/127,64/127,39/126,754 (arom.), 112,94 (d, DMTr), 96,46 (d, 5—C), 87,99 (d, 1'—C), 86,62 (s, C—(Ph)3), 83,51 (d, 2'—C), 82,46 (d, 4'—C), 67,42 (d, 3'—C), 60,58 (t, 5'—CH₂), 58,22 (q, OCH₃), 54,78 (q, DMTr OCH₃).

N⁴-Benzoyl-5'-O-dimethoxytrityl-3'-O-methylcytidin 6a

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 8,43 (d, J = 7,7 Hz, 1H; 6—H), 7,91 (d, J = 7,7, 2H, Bz), 7,65—7,2 (m, 13H; DMTr, Bz, 5—H), 6,9 (d, J = 9,7, 4H; DMTr), 5,98 (s, 1H; 1'—H), 4,47 (m, 1H; 2'—H), 4,31 (m, 1H; 4'—H), 4,02 (m, 1H; 3'—H), 3,82 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,6 (d, J = 10,3, 1H; 5'—H), 3,44 (s, 3H; 3'—OCH₃), 3,5—3,35 (m, 1H; 5'—H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 166,5 (s, Ar—NH—C=O), 162,51 (s, 4—C), 158,62 (s, arom., C—OCH₃), 155,34 (s, 2—C), 144,78 (d, 6—C), 144,01/135,49/135,24/132,98/130,0/129,88/128,83/128,08/127,96/127,65/127,08/113,26 (arom.), 96,89 (d, 5—C), 92,24 (d, 1'—C), 86,96 (s, C—(Ph)3), 81,5 (d, 4'—C), 78,01 (d, 3'—C), 73,92 (d, 2'—C), 61,64 (t, 5'—CH₂), 58,27 (q, OCH₃), 55,14 (q, DMTr OCH₃).

N⁴-Benzoyl-2'-O-methylcytidin 2a (wurde als durch Detritylierung von 3a erhaltenes Produkt charakterisiert): 430 mg (0,65 mmol) 3a wurden 5 min in 16 ml 2%iger Trichloressigsäurelösung in Dichlormethan gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser extrahiert, die vereinigten wäßrigen Phasen eingedampft und mittels Flashchromatographie gereinigt (9 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 4/1 dann 3/2): 220 mg (94%) 2a, weißer Schaum, DC: Dichlormethan/Methanol = 10/1. R_f = 0,2.

¹H-NMR (DMSO, 200 MHz): δ = 8,9 (m, 1H; 6—H), 8,69—7,42 (m, 3H; 3'—OH, 5'—OH, NH), 8,15 (d, J = 7,7 Hz, 2H; Bz), 7,78—7,42 (m, 4H; Bz, 5—H), 5,83 (s, 1H; 1'—H), 4,12 (m, 1H; 3'—H), 3,98 (m, 1H; 4'—H), 3,87 (m, 2H; 2'—H, 5'—H), 3,67 (d, J = 12,7 Hz, 1H; 5'—H), 3,48 (s, 3H; 2'—OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO, 50 MHz): δ = 166,69 (s, Ar—NH—C=O), 160,09 (s, 4—C), 149,22 (s, 2—C/d, 6—C), 133,87 (d, arom.), 131,71/128,86/128,79 (arom.), 95,34 (d, 5—C), 88,78 (d, 1'—C), 84,55 (d, 4'—C), 83,38 (d, 2'—C), 67,11 (d, 3'—C), 58,96 (t, 5'—CH₂), 58,09 (q, OCH₃).

N⁴-Benzoyl-3'-O-methylcytidin 5a (erhalten durch Detritylierung von 6a): 400 mg (0,60 mmol) 6a wurden in 10 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf —5°C abgekühlt. Die Lösung wurde mit 0,2 ml einer 10%igen etherischen Salzsäurelösung versetzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich sofort rot und es fiel ein Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde eingedampft und der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (8 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 2/1.) gereinigt und aus Ethylacetat/Methanol ausgefällt. Es wurden 194 mg (89,5%) 5a als weißer Schaum erhalten. DC: Dichlormethan/Methanol = 10/1. R_f = 0,4.

¹H-NMR (DMSO, 200 MHz): δ = 8,75 (d, J = 7,7 Hz, 1H; 6—H), 8,1 (d, J = 7,7 Hz, 2H; Bz) 7,74—7,37 (m, 4H; Bz, 5—H), 6,9—5,5 (m, 2H; 3'—OH, 5'—OH), 5,76 (s, 1H; 1'—H), 4,33 (m, 1H; 2'—H), 4,08 (m, 1H; 4'—H), 3,9—3,7 (m, 2H; 3'—H, 5'—H), 3,63 (d, J = 12,7 Hz, 1H; 5'—H), 3,34 (s, 3H; 3'—OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO, 50 MHz): δ = 166,95 (s, Ar—NH—C=O), 160,83 (s, 4—C), 150,54 (s, 2—C), 148,14 (d, 6—C), 133,53/132,15/128,75/128,66 (arom.), 95,40 (d, 5—C), 91,31 (d, 1'—C), 82,54 (d, 4'—C), 77,01 (d, 3'—C), 72,24 (d, 2'—C), 59,46 (t, 5'—CH₂), 57,38 (q, OCH₃).

N⁴-Benzoyl-2'-O-ethylcytidin 2b

45 g (0,185 mol) Cytidin wurden wie für 3a beschrieben gelöst und abgekühlt, mit 7,4 g (0,185 mol) Natriumhydrid (60% in Paraffin, gewaschen in wasserfreiem n-Hexan) versetzt und 1 h bei 0°C gerührt. Es wurden analog zu 3a 40,52 g (3,825 mol) Ethyljodid zugegeben. Reinigung durch SC (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/THF = 7/1) gereinigt und ergab 25,5 g farblosen Schaum, der mit 32,8 g (0,301 mol) Trimethylchlorsilan und 19,8 g (0,140 mol) Benzoylchlorid versetzt wurde. Nach Aufarbeitung wurde in Ethylacetat aufgenommen und zur Kristallisation gebracht. Nach Trocknen wurden 16,6 g (24%) Reinprodukt 2b, Schmelzpunkt 193—194°, erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃/DMSO, 200 MHz): δ = 10,5 (s br, 1H; NH), 8,62 (d, J = 8 Hz, 1H; 6—H), 8,03 (d, 2H; Bz), 7,70—7,30 (m, 4H; Bz, 5—H), 5,87 (s, 1H; 1'—H), 5,18* (s br, 1H; 5'—OH), 4,75* (s br, 1H; 3'—OH), 4,30—3,50 (m, 7H; 2'—H, 3'—H, 4'—H, O—CH₂—CH₃, 5'—CH₂), 1,21 (t, J = 7 Hz, 3H; O—CH₂—CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃/DMSO): δ = 166,25 (s, Ar—NH—C=O), 161,98 (s, 4—C), 153,48 (s, 2—C), 143,70 (d, 6—C), 132,01 (d, arom.), 131,22/127,01 (arom.), 95,18 (d, 5—C), 87,56 (d, 1'—C), 82,88 (d, 4'—C), 80,97 (d, 2'—C), 65,89 (d, 3'—C), 64,55 (t, O—CH₂—CH₃), 57,95 (t, 5'—CH₂), 13,98 (q, O—CH₂—CH₃).

N⁴-Benzoyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-ethylcytidin 3b

7,30 g (19,4 mmol) 2b wurden mit 9,88 g (29,2 mmol) Dimethoxytritylchlorid umgesetzt und analog zu 3a aufgearbeitet. Reinigung durch SC (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/Isopropanol = 30 : 1) ergab 7,43 g (56,6%) Reinprodukt 3b.

¹H-NMR (CD₃CN, 250 MHz): δ = 9,36 (s br, 1H, NH), 8,50 (d, J = 8 Hz, 1H; 6—H), 7,95 (d, J = 8 Hz, 2H; Bz 2,6—H), 7,70—7,20 (m, 12H; DMTr, Bz 3,4,5—H), 7,13 (d, J = 8 Hz, 1H; 5—H), 6,91 (m, 4H; DMTr), 5,84 (s, 1H;

1'-H), 4,42 (s br, 1H; 3'-OH), 4,20–3,10 (m, 13H; 2'-H, 3'-H, 4'-H, O—CH₂—CH₃, 5'-CH₂, [with 3,80 (s, 6H; DMTr OCH₃)], 1,22 (t, 3H; O—CH₂—CH₃).

¹³C-NMR (CD₃CN, 62,5 MHz) δ = 168,05 (s, Ar—NH—C = O), 163,64 (s, DMTr, C—OCH₃), 155,49 (s, 2-C), 145,81 (d, 6-C), 145,32/136,81 (arom., DMTr), 136,43/134,30/133,73 (arom.-C, C-Benzoyl), 130,98/130,81/129,50/129,06/128,92/128,88/127,93 (arom.-C), 114,06 (arom., DMTr), 96,92 (d, 5-C), 90,06 (d, 1'-C), 87,50 (s, C—(Ph)3), 83,49 (d, 4'-C), 82,74 (d, 2'-C), 68,66 (d, 3'-C), 67,00 (t, O—CH₂—CH₃), 62,01 (t, 5'-CH₂), 55,78 (q, DMTr OCH₃), 15,45 (q, O—CH₂—CH₃).

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methyl-N⁶-(phenoxyacetyl)-adenosin 9a

50 g (0,187 mol) Adenosin wurden 20 Stunden bei 80°C am Hochvakuum getrocknet und hierauf in 700 ml wasserfreiem Dimethylformamid unter Erwärmung gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und mit 5,34 g (0,224 mol) gewaschenem Natriumhydrid versetzt und 45 Minuten bei 0°C gerührt. Dann wurden portionsweise über einen Zeitraum von 4 Stunden und unter Erwärmung auf Raumtemperatur insgesamt 42,2 g (0,3 mol) Methyljodid (20%ig in Dimethylformamid) zugetropft. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und zu dem Zeitpunkt abgebrochen, als der Anteil an dimethyliertem Produkt im Reaktionsgemisch stark anstieg. Bei der Aufarbeitung wurde nicht gelöstes Natriumjodid abgetrennt und das Reaktionsgemisch am Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie gereinigt (Substanz/Kieselgel = 1/10, Eluens: Gradient von 5–20% Methanol in Chloroform). Die erhaltenen 42 g Rohprodukt (Gemisch der 2'- und 3'-O-Methyl Isomeren, mit Natriumjodid verunreinigt; DC: Chloroform/Ethanol = 3/1, R_f = 0,3 für beide Isomere) wurden mehrmals mit einem Gemisch aus Benzol und Pyridin abgeschleppt und in 500 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Anschließend wurden bei Raumtemperatur 64,8 g (0,597 mol) Trimethylchlorsilan zugetropft und nach weiteren 2 Stunden wurden 51,2 g (0,179 mol) Phenoxyessigsäureanhydrid zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 1 Liter Wasser gegossen mit 400 ml Methanol verdünnt, sodaß eine klare Lösung erhalten wurde. Nach 40 Minuten wurde Natriumbicarbonat zugegeben noch weitere 10 Minuten gerührt und dann mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt (45 g) mit 8a/11a = 4,6/1 wurde dreimal mit Pyridin/Benzol abgeschleppt und in wasserfreiem Pyridin mit 53,2 g (0,157 mol) Dimethoxytritylchlorid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und zwischen Dichlormethan und Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt. Die wäßrige Phase wurde mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Die so erhaltenen 112 g Rohprodukt wurden mittels Flashchromatographie (1200 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan dann Dichlormethan/Aceton = 8/1) gereinigt. Es wurden 32,8 g 9a (24,5% bezogen auf Adenosin) und 3,3 g 12a als farblose Festkörper erhalten. DC: Dichlormethan/Aceton = 3,5/1,5 9a: R_f = 0,52, 12a: R_f = 0,48.

¹H-NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ = 9,5 (s br, 1H; NH), 8,72 (s, 1H; 2'-H), 8,28 (s, 1H; 8-H), 7,5–6,7 (m, 18H; DMTr, PhOAc), 6,2 (d, J = 3 Hz, 1H; 1'-H), 4,87 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,65–4,4 (m, 2H; 2'-H, 3'-H), 4,25 (m, 1H; 4'-H), 3,77 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,56 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,52 (m, 2H; 5'-H), 2,82 (s, 1H; 3'-OH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 22,5 MHz): δ = 167,03 (s, C=O), 158,09 (s, arom., C—OCH₃), 156,9 (s, arom., C—O—CH₂), 151,9 (d, 2-C), 150,89 (s, 6-C), 148,02 (s, 4-C), 144,17 (arom., DMTr), 141,95 (d, 8-C), 135,24 (arom., DMTr), 129,6 (d, arom., PhOAc), 129,22/128,68/127,70/127,38/126,46 (arom., DMTr), 122,45 (s, 5-C), 121,63/114,48 (2d, arom., PhOAc), 112,75 (arom., DMTr), 86,41 (d, 1'-C), 86,15 (s, C—(Ph)3), 83,75 (d, 4'-C), 82,68 (d, 2'-C), 69,35 (d, 3'-C), 68,0 (t, Ph—O—CH₂), 62,69 (t, 5'-CH₂), 58,24 (q, OCH₃), 54,67 (q, DMTr OCH₃).

5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-methyl-N⁶-(phenoxyacetyl)adenosin 12a

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 9,43 (s br, 1H; NH), 8,73 (s, 1H; 2'-H), 8,22 (s, 1H; 8-H), 7,46–6,99 (m, 14H; DMTr, PhOAc), 6,81 (d, J = 9,7 Hz, 4H; DMTr), 6,04 (d, J = 6,5 Hz, 1H; 1'-H), 5,01–4,8 (m, 1H; 2'-H), 4,89 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,4–4,27 (m, 1H; 4'-H*), 4,18–4,06 (m, 1H; 3'-H*), 3,79 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,57–3,26 (m, 2H; 5'-CH₂), 3,5 (s, 3H; 3'-OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 166,74 (s, Ar—NH—C=O), 158,47 (s, arom., C—OCH₃), 156,98 (s, arom., C—O—CH₂), 152,29 (d, 2-C), 151,40 (s, 6-C), 148,25 (s, 4-C), 144,34 (arom., DMTr), 142,11 (d, 8-C), 135,43 (arom., DMTr), 129,87 (d, arom., PhOAc), 129,67/127,94/127,78/126,84 (4d, DMTr), 122,85 (s, 5-C), 122,21/114,83 (d, arom., PhOAc), 113,09 (d, arom., DMTr), 89,27 (d, 1'-C), 86,52 (s, C—(Ph)3), 81,89 (d, 4'-C), 79,97 (d, 3'-C), 73,59 (d, 2'-C), 68,06 (t, Ph—O—CH₂), 63,12 (t, 5'-CH₂), 58,13 (q, OCH₃), 55,09 (q, DMTr OCH₃).

2'-O-Methyl-N⁶-(phenoxyacetyl)adenosin 8a: Das aus analogem Ansatz erhaltene Produktgemisch 8a/11a wurde mittels Flashchromatographie (400 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 4/1) gereinigt. Nach einmaliger Chromatographie wurden 5,5 g (7,05%) 8a, mit den unten angegebenen analytischen NMR-Daten, und 14,1 g (18,1%) 8a/11a erhalten. DC: Dichlormethan/Methanol = 4,5/0,5. 8a: R_f = 0,50; 11a: R_f = 0,48.

¹H-NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ = 9,70 (s br, 1H; NH), 8,7 (s, 1H; 2'-H), 8,1 (s, 1H; 8-H), 7,4–6,8 (m, 5H; PhOAc arom.), 5,95 (d, J = 6 Hz, 1H; 1'-H), 5,7 (s br, 1H; 5'-OH), 4,88 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,7–4,5 (m, 2H; 2'-H, 3'-H), 4,3 (s, 1H; 4'-H), 4,05–3,6 (m, 2H; 5'-CH₂), 3,45 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,12 (s, 1H; 3'-OH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 22,5 MHz): δ = 167,5 (s, Ar—NH—C=O), 157,01 (s, arom., C—O—CH₂), 151,6 (d, 2-C), 150,41 (s, 6-C), 148,67 (s, 4-C), 143,41 (d, 8-C), 129,38 (d, arom.), 123,26 (s, 5-C), 121,85/114,73 (d, arom.), 88,53 (d, 1'-C), 87,40 (d, 4'-C), 82,8 (d, 2'-C), 69,73 (d, 3'-C), 68,21 (t, Ph—O—CH₂), 62,3 (t, 5'-CH₂), 58,3 (q, 2'-OCH₃).

3'-O-Methyl-N⁶-(phenoxyacetyl)adenosin 11a wurde als Reinprodukt durch Detritylierung von 12a erhalten: 1 g (1,39 mmol) 12a wurden in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und auf –5°C abgekühlt. Die Lösung

wurde mit 0,5 ml einer 10%igen etherischen Salzsäurelösung versetzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich sofort rot und ein Niederschlag fiel aus. Nach einer Minute wurde die Reaktionslösung mit wäßriger Natriumbicarbonatlösung verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (12 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 3,5/1) gereinigt. Es wurden 530 mg (92%) 11a erhalten. DC: Dichlormethan/Methanol = 9/1; R_f = 0,48, weißer Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 9,58 (s br, 1H; NH), 8,72 (s, 1H; 2-H), 8,08 (s, 1H; 8-H), 7,42–7,26 (m, 2H; PhOAc arom.), 7,13–7,0 (m, 3H; PhOAc arom.), 5,82 (d, J = 7,7 Hz, 1H; 1'-H), 5,02 (dd, J_1 = 5,5, J_2 = 7,7, 1H; 2'-H), 4,88 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,36* (s, 1H; 4'-H), 4,1* (d, J = 5,5 Hz, 1H; 3'-H), 4,02/3,74 (2d, J = 12,8 Hz, 2H; 5'-CH₂), 3,54 (s, 3H; 3'-OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 22,5 MHz): δ = 167,0 (s, Ar–NH–C=O), 156,95 (s, arom., C–O–CH₂), 151,79 (d, 2-C), 150,38 (s, 6-C), 148,77 (s, 4-C), 143,5 (d, 8-C), 129,71 (d, arom.), 123,59 (s, 5-C), 122,28/114,82 (d, arom.), 91,8 (d, 1'-C), 84,57 (d, 4'-C), 80,79 (d, 3'-C), 73,52 (d, 2'-C), 68,06 (t, Ph–O–CH₂), 63,34 (t, 5'-CH₂), 58,0 (q, 3'-OCH₃).

15 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyl-N⁶-(phenoxyacetyl)adenosin 9b

50 g (0,187 mol) Adenosin wurden wie für 9a beschrieben gelöst, abgekühlt und mit 8,98 g (0,225 mol) Natriumhydridsuspension (60% in Paraffin, gewaschen mit wasserfreiem n-Hexan) versetzt. 34,8 g (0,225 mol) Ethyljodid in 40 ml wasserfreiem DMF wurden portionsweise zugegeben. Nach 2 h Röhren bei 0°C wurden 46,5 g (0,300 mol) Ethyljodid in 50 ml wasserfreiem DMF zugegeben und weitere 2 h bei 0°C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte in Analogie zu 8a und ergab 30,0 g farblosen Schaum. Dieser wurde wie für 9a beschrieben mit 44,1 g (0,406 mol) Trimethylchlorsilan und 58,4 g (0,203 mol) Phenoxyessigsäureanhydrid umgesetzt und aufgearbeitet. SC-Reinigung (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/THF = 1/1) ergab 19,7 g (25%) Rohprodukt 8b/11b (Verhältnis 14 : 1) als farblosen Schaum. 19,6 g des Rohproduktes wurden getrocknet, danach in 100 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 23,2 g (0,069 mol) Dimethoxytritylchlorid versetzt. Die Umsetzung erfolgte analog zu 8a/11a. SC-Reinigung (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/THF = 12/1 bis 6/1) ergab 4,8 g 9b (3,5% Th. ausgehend von Adenosin) als farblosen Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN , 250 MHz): δ = 9,5 (s, 1H; NH), 8,58 (s, 1H; 2-H), 8,30 (s, 1H; 8-H), 7,5–6,7 (m, 18H; DMTr, PhOAc), 6,15 (d, J = 3 Hz, 1H; 1'-H), 4,99 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,64–4,44 (m, 2H; 2'-H, 3'-H), 4,11 (m, 1H; 4'-H), 3,76 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,7–3,3 (m, 5H; O–CH₂–CH₃, 5'-CH₂, 3'-OH), 1,15 (t, 3H; O–CH₂–CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3CN , 62,5 MHz): δ = 168,17 (s, Ar–NH–C=O), 159,52 (s, arom., C–OCH₃), 158,54 (s, arom., C–OCH₂), 152,76 (d, 2-C), 152,28 (s, 6-C), 149,51 (s, 4-C), 145,86 (arom.; DMTr), 143,49 (d, 8-C), 136,67 (arom., DMTr), 130,90 (d, arom. PhOAc), 130,86/130,54/128,86/128,68/127,71 (arom., DMTr), 123,86 (s, 5-C), 122,56/115,56 (d, arom., PhOAc), 113,88 (arom.; DMTr), 87,99 (d, 1'-C), 87,02 (s, C-(Ph)3), 84,81 (d, 4'-C), 81,76 (d, 2'-C), 70,47 (d, 3'-C), 68,92 (t, Ph–O–CH₂), 67,20 (t, O–CH₂–CH₃), 64,03 (t, 5'-CH₂), 55,76 (q, DMTr OCH₃), 15,38 (q, O–CH₂–CH₃).

2'-O-Ethyl-(phenoxyacetyl)adenosin (8b): NMR-Daten aus 8b/11b-Gemisch (14 : 1) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): δ = 9,93 (s br, 1H; NH), 8,96 (s, 1H; 2-H), 8,36 (s, 1H; 8-H), 7,6–6,9 (m, 5H; PhOAc arom.), 6,10 (d, J = 6 Hz, 1H; 1'-H), 5,8–5,6 (m, 1H; 5'-OH), 4,92–4,55 (m, 4H; PhOAc CH₂, 2'-H, 3'-H), 4,40 (s, 1H; 4'-H), 4,05–3,41 (m, 5H; 5'-CH₂, O–CH₂–CH₃, 3'-OH), 1,09 (t, 3H; O–CH₂–CH₃). – charakteristische Lage von 11b im Gemisch: δ = 5,9 (d, J = 6 Hz, 1'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 22,5 MHz): δ 167,50 (s, Ar–NH–C=O), 157,05 (s, arom., C–O–CH₂), 151,67 (d, 2-C), 150,45 (s, 6-C), 148,73 (s, 4-C), 143,40 (d, 8-C), 129,42 (d, arom.), 123,35 (s, 5-C), 121,91/114,73 (d, arom.), 88,60 d, 1'-C), 87,44 (d, 4'-C), 82,81 (d, 2'-C), 69,75 (d, 3'-C), 68,31 (t, Ph–O–CH₂), 67,60 (t, O–CH₂–CH₃), 63,01 (t, 5'-CH₂), 15,45 (q, O–CH₂–CH₃).

2'-O-Methyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]guanosin 14a

8,1 g (18,7 mmol) 13 (2) wurden mehrmals mit Dimethylformamid/Benzol abgeschleppt, in 130 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und bei –60°C mit 0,72 g (30 mmol) gewaschenem Natriumhydrid versetzt und 45 Minuten bei –50°C gerührt. Hierauf wurden innerhalb von 5 Stunden 21,3 g (0,15 mol) Methyljodid zugetropft und das Reaktionsgemisch auf –15°C erwärmt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit Ammoniumchlorid versetzt und bis zur Trockene eingedampft. Der ölige Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (220 g Kieselgel, Eluens: Chloroform/Methanol = 80/1) gereinigt. Es wurden 4,0 g (48%) Isomerengemisch 14a/19a = 86/14 erhalten. Durch dreimalige Umkristallisation aus Benzol/Chloroform konnten 1,8 g (22%) 14a (<1% 19a) mit den unten angegebenen analytischen Daten erhalten werden. Die Mutterlaugen wurden eingedampft und der Rückstand, 2,2 g (26,5% 19a) säulenchromatographisch (250 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Isopropanol = 30/1) gereinigt, wobei 1,7 g (20,4%) weiße Kristalle 14a/19a = 82/18 erhalten wurden. DC: Dichlormethan/Isopropanol = 5/1, R_f = 0,57 (14a), R_f = 0,61 (19a).

14a: farblose Kristalle, Fp.: 109–111°C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 8,17 (d, J = 9 Hz, 2H; NPE), 7,65 (s, 1H; 8-H), 7,48 (d, J = 9 Hz, 2H; NPE), 6,68 (d, J = 12 Hz, 1H; 5'-OH), 5,75 (d, J = 8 Hz, 1H; 1'-H), 4,98 (s br, 2H; NH₂), 4,73 (t, J = 7,3 Hz, 2H; NPE O–CH₂), 4,65 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 4,6 Hz, 1H, 2'-H), 4,55 (d, J = 4,6 Hz, 1H; 3'-H), 4,32 (s, 1H; 4'-H), 3,95/3,74 (AB, J_{AB} = 13,3 Hz, J_{BX} = 12 Hz, 2H; 5'-CH₂), 3,35 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,28 (t, J = 7,3 Hz, 2H; NPE CH₂–Ph), 2,87 (s, 1H; 3'-OH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 22,5 MHz): δ = 159,1 (s, 6-C), 157,07* (s, 2-C), 150,96* (s, CH₂-C(Ph)), 145,24* (s, 4-C), 143,93* (s, O₂N-C(Ph)), 138,02 (d, 8-C), 128,69/122,25 (d, arom., NPE), 115,55 (s, 5-C), 88,42 (d, 1'-C), 87,1 (d, 4'-C), 82,11 (d, 2'-C), 70,36 (d, 3'-C), 66,29 (t, O-CH₂ NPE), 63,0 (t, 5'-CH₂), 58,54 (q, 2'-OCH₃), 35,54 (t, CH₂-Ph NPE).

2'-O-Ethyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]guanosin 14b

3,15 g (7,29 mmol) 13 wurden wie für 14a beschrieben getrocknet in 30 ml DMF gelöst, auf -60°C abgekühlt und mit 0,263 g (6,6 mmol) 60% Natriumhydridsuspension (gewaschen mit wasserfreiem n-Hexan) versetzt und bei -15°C 1 h gerührt. Dann wurden 4,31 g (29,2 mmol) Ethyljodid, nach 60 min 2,15 g (14,6 mmol) und nach weiteren 60 min noch einmal 2,15 g (14,6 mmol) Ethyljodid zugegeben und die Temperatur in dieser Zeit langsam auf 0°C angehoben. 3 h nach der letzten Zugabe wurde aufgearbeitet und mittels SC (Kieselgel feinst, Eluens: Dichlormethan/Isopropanol = 16 : 1) gereinigt. Es wurden 0,440 g (13%) Reinprodukt 14b als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 8,17 (d, J = 9,5 Hz, 2H; NPE), 7,65 (s, 1H; 8-H), 7,48 (d, J = 9,5 Hz, 2H; NPE), 6,68 (d, J = 12,5 Hz, 1H; 5'-OH), 5,75 (d, J = 7,6 Hz, 1H; 1'-H), 4,98 (s, 2H; NH₂), 4,83-4,62 (m, 2H; NPE O-CH₂), 4,49 (d, J = 4,5 Hz, 1H; 3'-H), 4,33 (s, 1H; 4'-H), 4,12-3,88 (m, 2H; 5'-CH₂), 3,85 (m, 2H; O-CH₂-CH₃), 3,28 (t, J = 6,4 Hz, 2H; NPE CH₂-Ph), 2,85 (s, 1H; 3'-OH), 1,10 (t, J = 6,4 Hz, O-CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 22,5 MHz): δ = 159,1 (s, 6-C), 157,07 (s, 2-C), 150,96* (s, 4-C), 145,24* (s, CH₂-C(Ph)), 143,93 (s, O₂N-C(Ph)), 138,02 (d, 8-C), 128,65/122,25 (d, arom. NPE), 115,55 (s, 5-C), 88,42 (d, 1'-C), 87,1 (d, 4'-C), 82,11 (d, 2'-C), 70,36 (d, 3'-C), 66,29 (t, O-CH₂ NPE), 65,38 (t, O-CH₂-CH₃), 63,01 (t, 5'-CH₂), 35,54 (t, CH₂-Ph NPE), 15,04 (q, O-CH₂-CH₃).

2'-O-Methyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin 15a

a) 1,5 g (3,3 mmol) 14a wurden dreimal mit Pyridin/Benzol abgeschleppt und in 150 ml Pyridin gelöst. Innerhalb von 30 Minuten wurden bei Raumtemperatur 1,78 g (16,5 mmol) Trimethylchlorsilan zugetropft. Nach 2 Stunden wurden 1,32 g (4,6 mmol) Phenoxyessigsäureanhydrid zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 250 ml Wasser/Methanol = 1/1 und mit 10 ml conc. wäßrigem Ammoniak versetzt, nach 10 Minuten wurde die wäßrige Phase siebenmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Es wurden 1,85 g (95%) 15a, farbloser, fester Schaum mit den unten angegebenen analytischen Daten erhalten.

b) Es wurden dieselben Versuchsbedingungen gewählt, doch wurden 1,7 g (3,81 mmol) 14a/19/a = 82/18 eingesetzt. Es wurden 1,8 g (81%) 15a/20a erhalten. DC: Chloroform/Methanol = 5/0,3, R_f = 0,36 für 15a, R_f = 0,38 für 20a.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 8,98 (s br, 1H; NH), 8,15 (d, J = 8,5 Hz, 2H; NPE) 8,00 (s, 1H; 8-H), 7,52 (d, J = 8,5 Hz, 2H; NPE), 7,42-7,26 (m, 2H; PhOAc arom.), 7,14-6,93 (m, 3H; PhOAc arom.), 5,92 (d, J = 6,2 Hz, 1H; 1'-H), 5,05 (s br, 1H; OH), 4,85 (t, J = 6,8 Hz, 2H; NPE O-CH₂), 4,69 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,65 (m, 2H; 2'-H, 3'-H), 4,3 (s, 1H; 4'-H), 4,02 (d, J = 12,5 Hz, 1H; 5'-H), 3,84 (d, J = 12,5 Hz, 1H; 5'-H), 3,39 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,35 (t, J = 6,8 Hz, 2H; NPE CH₂-Ph).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 165,95 (s, NH-C=O), 160,8 (s, 6-C), 156,8 (s, CH₂-O-C(Ph)), 151,68* (s, 2-C), 150,61* (s, CH₂-C(Ph) NPE), 146,76* (s, 4-C), 145,40* (s, O₂N-C(Ph)), 142,18 (d, 8-C), 129,91/129,75 (d, arom. Phenoxyac.), 123,62 (d, arom. NPE), 122,41 (arom.), 119,81 (s, 5-C), 114,77 (arom.), 88,54 (d, 1'-C), 87,11 (d, 4'-C), 82,44 (d, 2'-C), 69,85 (d, 3'-C), 67,56 (t, O-CH₂ NPE), 67,17 (t, CH₂-O-Ph), 62,47 (t, 5'-CH₂), 58,63 (q, OCH₃), 34,87 (t, CH₂-Ph NPE).

2'-O-Ethyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin 15b

0,440 g (0,96 mmol) 14b wurden analog zu 15a mit 0,521 g (4,8 mmol) Trimethylchlorsilan und 0,440 g (1,54 mmol) Phenoxyessigsäureanhydrid versetzt. Nach gleichen Reaktionsbedingungen und analoger Aufarbeitung wurde durch SC-Reinigung (Kieselgel feinst, Eluens: Dichlormethan/Isopropanol = 10 : 1) 0,470 g (82%) Reinprodukt 15b als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 8,98 (s br, 1H; NH), 8,62 (m, 1H; OH), 8,15 (d, J = 8,4 Hz, 2H; NPE arom.), 7,91 (s, 1H; 8-H), 7,56 (d, J = 8,4 Hz; NPE arom.), 7,44-7,25 (m, 2H; PhOAc arom.), 7,15-6,95 (m, 3H; PhOAc arom.), 5,90 (d, J = 7,3 Hz, 1H; 1'-H), 4,88 (d, J = 7,3 Hz, 1H; 2'-H), 4,85 (t, J = 7,3 Hz, 2H; NPE O-CH₂), 4,68 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,65 (m, 1H; 3'-H), 4,30 (s, 1H; 4'-H), 4,02/3,84 (2d, J = 12,5 Hz, 2H; 5'-CH₂), 3,44-3,27 (m, 2H; O-CH₂-CH₃), 3,35 (t, J = 7,3 Hz, 2H; NPE CH₂-Ph), 1,15 (t, 3H; O-CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 165,95 (s, NH-C=O), 160,80 (s, 6-C), 156,50 (s, CH₂O-C(Ph)), 151,70 (s, 2-C), 150,65* (s, 4-C), 146,75* (s, CH₂-C(Ph) NPE), 145,40 (s, O₂N-C(Ph)), 142,20 (d, 8-C), 129,90/129,75 (d, arom. PhOAc), 123,62 (d, arom. NPE), 122,40 (arom.), 119,85 (s, 5-C), 114,76 (arom.), 88,55 (d, 1'-C), 87,13 (d, 4'-C), 82,43 (d, 2'-C), 69,87 (d, 3'-C), 67,56 (t, O-CH₂ NPE), 67,16 (t, CH₂-O-Ph), 67,61 (t, O-CH₂-CH₃), 62,42 (t, 5'-CH₂), 34,83 (t, CH₂-Ph NPE), 15,18 (q, O-CH₂-CH₃).

5'-O-Dimethoxynitril-2'-O-methyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin 16a

3,0 g (5,18 mmol) 15a als Gemisch mit 0,3 g Regioisomer 20a wurden dreimal mit Pyridin/Benzol abgeschleppt, in 350 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 2,13 g (6,3 mmol) Dimethoxytritylchlorid 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und zwischen Dichlormethan und wäßriger Natriumbi-

DE 41 10 085 A1

carbonatlösung verteilt. Die wäßrige Phase wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Der erhaltene Schaum wurde säulenchromatographisch (500 g Kieselgel, Eluens: Toluol/Isopropanol = 30/1) gereinigt. Es wurden 4,1 g 16a (81%) und 0,3 g 21a (6%) als gelbliche feste Öle erhalten. DC: Toluol/Isopropanol = 9/1, R_f = 0,24 für 16a, R_f = 0,28 für 21a.

5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 8,75 (s, 1H; NH), 8,18 (d, J = 10 Hz, 2H; NPE arom.), 8,09 (s, 1H; 8-H), 7,55 (d, J = 10 Hz, 2H; NPE arom.), 7,47 – 6,93 (m, 14H; DMTr, PhOAc), 6,80 (d, J = 9,6 Hz, 4H; DMTr), 6,05 (d, J = 2,6 Hz, 1H; 1'-H), 4,86 (t, J = 6,7 Hz, 2H; NPE O-CH₂), 4,69 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,57 (dd, J_1 = 10, J_2 = 6,7, 1H; 3'-H), 4,42 – 4,32 (m, 1H; 2'-H), 4,24 – 4,13 (s, 1H; 4'-H), 3,78 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,63 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,48 (s, 2H; 5'-CH₂), 3,34 (t, 2H; NPE CH₂-Ph), 2,65 (d, J = 6,7 Hz, 1H; 3'-OH).

10 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 165,77 (s, C=O), 160,23 (s, 6-C), 158,15 (s, CH₃O-C(Ph), DMTr), 156,67 (s, CH₂-O-C(Ph)), 152,00* (s, 2-C), 150,65* (s, CH₂-C(Ph) NPE), 146,48* (s, 4-C), 145,23* (s, O₂N-C(Ph)), 144,13 (s, arom., DMTr), 140,02 (d, 8-C), 135,3/135,21/129,68/129,62/129,46/127,76/127,48/126,54/123,34/122,04 (arom.) 118,53 (s, 5-C), 114,48 (arom., PhOAc), 112,78 (arom., DMTr), 86,19 (s, C(Ph)3), 86,19 (d, 1'-C), 83,57 (d, 4'-C), 83,07 (d, 2'-C), 69,35 (d, 3'-C), 67,53 (t, O-CH₂ NPE), 66,75 (t, CH₂-O-Ph), 62,79 (t, 5'-CH₂), 58,5 (q, OCH₃), 54,78 (q, DMTr OCH₃), 34,87 (t, CH₂-Ph NPE).

5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-methyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin 21a

20 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 8,83 (s, 1H; NH), 8,07 (d, J = 9,3 Hz, 2H; NPE arom.), 8,02 (s, 1H; 8-H), 7,4 (d, J = 9,3 Hz, 2H; NPE arom.), 7,33 – 6,9 (m, 14H; DMTr, PhOAc), 6,6 (d, J = 9 Hz, 4H; DMTr), 5,87 (d, J = 6,3 Hz, 1H; 1'-H), 5,64 (s, 1H; 2'-OH), 4,94 (dd, J_1 = 6,3, J_2 = 5,3, 1H; 2'-H), 4,75 (t, J = 6,7 Hz, 2H; NPE O-CH₂), 4,57 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,29* (m, 1H; 3'-H), 4,03* (m, 1H; 4'-H), 3,67 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,5 (s, 3H; 3'-OCH₃), 3,33 – 3,08 (m, 4H; 5'-CH₂, NPE CH₂-Ph).

25 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 165,76 (s, C=O), 160,3 (s, 6-C), 158,08 (s, CH₃O-C(Ph), DMTr), 156,54 (s, CH₂-O-C(Ph)), 151,55* (s, 2-C), 150,18* (s, NPE), 146,47* (s, 4-C), 145,17* (s, NPE), 144,03 (arom., DMTr), 140,63 (d, 8-C), 135,15/135,06/129,53/127,57/127,37/126,42/123,34/122,18 (arom.), 118,82 (s, 5-C), 114,51 (arom., PhOAc), 112,68 (arom., DMTr), 90,40 (d, 1'-C), 86,15 (s, C(Ph)3), 83,47 (d, 4'-C), 81,21 (d, 3'-C), 75,29 (d, 2'-C), 67,40 (t, O-CH₂ NPE), 66,82 (t, CH₂-O-Ph), 63,51 (t, 5'-CH₂), 58,45 (q, 3'-OCH₃), 54,73 (q, DMTr OCH₃), 34,65 (t, CH₂-Ph NPE).

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin 16b

30 0,470 g (0,79 mmol) 15b wurden analog zu 16a getrocknet, gelöst, mit 0,321 g (0,95 mmol) Dimethoxytritylchlorid versetzt und in gleicher Weise aufgearbeitet. Durch SC (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/Aceton = 15/1) wurden 483 mg (67,6%) Reinprodukt 16b als gelbes Pulver erhalten.

35 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): δ = 8,88 (s, 1H; NH), 8,10 (d, J = 9,2 Hz, 2H; NPE arom.), 8,04 (s, 1H; 8-H), 7,56 (d, J = 9,2 Hz, 2H; NPE arom.), 7,44 – 6,60 (m, 18H; DMTr, PhOAc), 6,00 (d, J = 4,5 Hz, 1H; 1'-H), 4,88 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,83 (t, J = 6,9 Hz, 2H; NPE O-CH₂), 4,66 – 4,48 (m, 2H; 2'-H, 3'-H), 4,18 – 3,94 (m, 1H); 4'-H), 3,72 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,68 – 3,51 (m, 2H; O-CH₂-CH₃), 3,50 – 3,15 (m, 5H; 5'-CH₂, NPE CH₂-Ph), 3'-OH), 1,13 (t, 3H; O-CH₂-CH₃).

40 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 165,77 (s, NH-C=O), 160,59 (s, 6-C), 158,50 (s, CH₃O-C(Ph)), 157,02 (s, CH₂-O-C(Ph)), 152,38 (s, 2-C), 150,98* (s, 4-C), 146,86* (s, CH₂-C(Ph, NPE)), 145,56 (s, O₂N-C(Ph)), 144,48 (s, arom., DMTr), 140,39 (d, 8-C), 135,65/135,56/130,01/129,81/128,10/127,82/126,88/123,71/122,40 (arom.), 118,89 (s, 5-C), 114,82 (arom., PhOAc), 113,12 (arom., DMTr), 86,95 (d, 1'-C), 86,53 (s, C(Ph)3), 84,01 (d, 4'-C), 81,54 (d, 3'-C), 76,36 (d, 2'-C), 67,87 (t, O-CH₂ NPE), 67,10 (t, CH₂-O-Ph), 66,91 (t, O-CH₂-CH₃), 63,22 (t, 5'-CH₂), 55,13 (q, DMTr OCH₃), 35,03 (t, CH₂-Ph NPE), 15,20 (q, O-CH₂-CH₃).

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methyl-N²-(phenoxyacetyl)-guanosin 18a

50 150 mg (0,17 mmol) 16a wurden in 5 ml einer 0,5molaren Lösung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in Pyridin 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 1,5 ml 1M wäßrige Essigsäure zugetropft, es wurde mit Wasser verdünnt und die wäßrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Der ölige Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (4 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton/Triethylamin = 100/10/2) gereinigt. Es wurden 95 mg (76%) farbloses festes Öl 18a erhalten. DC: Chloroform/Methanol = 4,8/0,3, R_f = 0,38.

55 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 9,1 (s br, 1H; NH), 7,87 (s, 1H; 8-H), 7,49 – 6,75 (m, 18H; DMTr), 6,02 (d, J = 5,3 Hz, 1H; 1'-H); 4,65 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,48 (m, 1H; 3'-H), 4,33 – 4,15 (m, 2H; 2'-H, 4'-H), 3,78 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,49 (s, 3H; 2'-OCH₃), 3,44 (s, 2H; 5'-CH₂), 2,78 (s br, 1H; 3'-OH).

60 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 169,5 (s, NH-C=O), 158,61 (s, CH₃O-C(Ph), DMTr), 156,3 (s, CH₂-O-C(Ph)), 155,26 (s, 6-C), 147,78 (s, 2-C), 146,29 (s, 4-C), 144,33 (s, arom., DMTr), 137,17 (d, 8-C), 135,47/135,37 (arom., DMTr) 129,98 (arom.-C, PhOAc), 128,09/127,91/127,03 (arom., DMTr), 123,01 (s, 5-C), 122,05/114,83 (arom., PhOAc), 113,2 (arom., DMTr), 86,74 (s, C(Ph)3), 85,47 (d, 1'-C), 84,15 (d, 4'-C), 83,85 (d, 2'-C), 69,96 (d, 3'-C), 66,88 (t, CH₂-O-Ph), 63,3 (t, 5'-CH₂), 58,85 (q, 2'-OCH₃), 55,2 (q, DMTr OCH₃).

65 $N^3\text{-Cyanoethyl-5'-O-monomethoxytrityluridin 24a}$

7 g (13,6 mmol) 23a (hergestellt nach Schaller, H., et al. (1963), J. Am. Chem. Soc., 3821 – 27) wurden dreimal mit

Dimethylformamid/Benzol abgeschleppt und in 100 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst, auf 0°C abgekühlt und mit 325 mg (13,6 mmol) gewaschenem Natriumhydrid versetzt und eine Stunde bei 0°C gerührt. Hierauf wurden innerhalb von 12 Stunden 14,4 g (0,272 mol) Acrylnitril zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 80°C erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde auf Wasser/Dichlormethan geleert und die wäßrige Phase wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft.

Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (200 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 30/1) gereinigt. Es wurden 3,5 g (45%) weißer Schaum 24a erhalten. DC: Dichlormethan/Aceton = 33/2, R_f = 0,42. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): δ = 7,95 (d, J = 8,1 Hz, 1H; 6 – H), 7,45 – 7,1 (m, 12H; MMTr), 6,83 (d, J = 9 Hz, 2H; MMTr), 5,92 (d, J = 3 Hz, 1H; 1' – H), 5,44 (d, J = 8,1 Hz, 1H; 5 – H), 4,6 – 4,0 (m, 5H; 2' – H, 3' – H, N – CH₂, 4' – H), 3,78 (s, 3H; MMTr OCH₃), 3,51 (m, 2H; 5' – H), 2,53 (t, J = 7,2 Hz, 2H; CH₂CN). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 22,5 MHz): δ = 161,89 (s, 4 – C), 158,64 (s, arom., C – OCH₃), 150,99 (s, 2 – C), 143,68/143,17 (arom.), 138,59 (d, 6 – C), 134,48/132,25/128,19/127,81/127,11 (arom.), 117,52 (s, CN), 113,18 (arom.), 101,37 (d, 5 – C), 90,43 (d, 1' – C), 87,18 (s, C – (Ph)3), 83,66 (d, 4' – C), 75,26 (d, 2' – C), 69,84 (d, 3' – C), 62,09 (t, 5' – CH₂), 55,05 (q, OCH₃), 36,46 (t, N – CH₂), 15,98 (t, CH₂CN).

5

10

15

N³-Cyanoethyl-5'-O-dimethoxytrityluridin 24b

40 g (0,076 mol) 23b (hergestellt nach Schaller, H., et al. (1963) J. Am. Chem. Soc., 3821 – 27) wurden in Analogie zu oben mit 2,9 g (0,076 mol) Natriumhydridsuspension (60%ige Suspension, gewaschen mit wasserfreiem n-Hexan) versetzt. Innerhalb von 12 h wurden 1,52 mol Acrylnitril zugegeben und das Reaktionsgemisch auf 110°C erwärmt. Aufarbeitung wie oben beschrieben und Reinigung durch SC (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/Aceton = 30 : 1) ergaben 24,0 g (55%) 24b als weißen Schaum.

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): δ = 7,95 (d, J = 8 Hz, 1H; 6 – H), 7,45 – 7,10 (m, 9H; DMTr), 6,83 (d, J = 9 Hz, 4H; DMTr), 5,92 (d, J = 3 Hz, 1H; 1' – H), 5,45 (d, J = 8 Hz, 1H; 5 – H), 4,60 – 4,00 (m, 5H; 2' – H, 3' – H, N – CH₂, 4' – H), 3,78 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,50 (m, 2H; 5' – H), 2,53 (t, J = 7,2 Hz, 2H; CH₂CN).

25

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 22,5 MHz): δ = 161,89 (s, 4 – C), 158,64 (s, arom., C – OCH₃), 150,96 (s, 2 – C) 143,65 (arom.), 138,54 (d, 6 – C), 134,46/132,23/128,18/127,80 (arom.), 117,50 (s, CN), 113,18 (arom.) 101,36 (d, 5 – C), 90,41 (d, 1' – C), 87,18 (s, C – (Ph)3), 83,66 (d, 4' – C), 75,24 (d, 2' – C), 69,82 (d, 3' – C), 62,09 (t, 5' – CH₂), 55,05 (q, DMTr OCH₃), 36,46 (t, N – CH₂), 15,95 (t, CH₂CN).

30

N³-Cyanoethyl-2'-O-methyl-5'-O-monomethoxytrityluridin 25a

a) 600 mg (1,05 mmol) 24a wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und auf –40°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 25 mg (1,04 mmol) gewaschenem Natriumhydrid wurde noch weitere 45 Minuten bei dieser Temperatur gerührt und dann 284 mg (2 mmol) Methyljodid zugespritzt und innerhalb von 3 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde Ammoniumchlorid zugegeben, das Reaktionsgemisch zur Trockene eingedampft und zwischen Wasser und Dichlormethan verteilt. Die wäßrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Produktgemisch aus 2'-methyliertem 25a, 3'-methyliertem 28a und 2',3'-dimethyliertem 29a wurde säulenchromatographisch (90 g Kieselgel, Eluens: Diethylether) getrennt. Es wurden 200 mg (33%) 25a, 48 mg (8%) 28a und 80 mg (13%) 29a als farblose feste Öle erhalten. DC: Dichlormethan/Aceton = 3,2/1,8, R_f = 0,80 für 25a, R_f = 0,74 für 28a, R_f = 0,87 für 29a.

35

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): δ = 8,11 (d, J = 8,1 Hz, 1H; 6 – H), 7,65 – 7,3 (m, 12H; MMTr), 6,88 (d, J = 9 Hz, 2H; MMTr), 6,0 (d, J = 1,5 Hz, 1H; 1' – H), 5,35 (d, J = 8,1 Hz, 1H; 5 – H), 4,48 (m, 1H; 3' – H), 4,29 (t, J = 6 Hz, 2H; N – CH₂), 4,08 (m, 1H; 4' – H), 3,95 (m, 1H; 2' – H), 3,82 (s, 3H; MMTr OCH₃), 3,75 (s, 3H; 2' – OCH₃), 3,60 (m, 2H; 5' – CH₂), 2,82 (t, J = 6 Hz, 2H; CH₂CN).

40

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 22,5 MHz): δ = 161,73 (s, 4 – C), 158,64 (s, arom., C – OCH₃), 150,13 (s, 2 – C), 143,69/143,41 (2s, arom.), 138,32 (d, 6 – C), 134,42/130,25/128,24/127,81/127,05 (arom.), 116,81 (s, CN), 113,13 (arom.) 101,15 (d, 5 – C), 87,61 (s, C – (Ph)3), 87,18 (d, 1' – C), 83,82 d, 2' – C), 83,01 (d, 4' – C), 68,11 (d, 3' – C), 61,06 (t, 5' – CH₂), 58,52 (q, 2' – OCH₃), 55,05 (q, MMTr OCH₃), 36,03 (t, N – CH₂), 15,07 (t, CH₂CN).

45

50

N³-Cyanoethyl-3'-O-methyl-5'-O-monomethoxytrityluridin 28a

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 7,86 (d, J = 8,4 Hz, 1H; 6 – H), 7,54 – 7,2 (m, 12H; MMTr), 6,86 (d, J = 9 Hz, 2H; MMTr), 5,91 (d, J = 3,6 Hz, 1H; 1' – H), 5,48 (d, J = 8,4 Hz, 1H; 5 – H), 4,4 – 4,15 (m, 4H; 2' – H, 4' – H, N – CH₂), 4,03 (m, 1H; 3' – H), 3,80 (s, 3H; MMTr OCH₃), 3,64 – 3,39 (m, 2H; 5' – H), 3,44 (s, 3H; 3' – OCH₃), 2,72 (t, J = 7,2 Hz, 2H; CH₂CN), 2,6 (s, 1H; OH).

55

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ = 161,61 (s, 4 – C), 158,44 (s, arom., C – OCH₃), 150,31 (s, 2 – C), 143,40/143,20 (arom.), 138,30 (d, 6 – C), 134,19/129,99/127,92 127,66/126,93 (arom.), 116,87 (s, CN), 112,94 (arom.), 101,21 (d, 5 – C), 90,13 (d, 1' – C), 86,96 (s, C(Ph)3), 80,70 (d, 4' – C), 78,27 (d, 3' – C), 73,35 (d, 2' – C), 61,98 (t, 5' – CH₂), 57,96 (q, 3' – OCH₃), 54,88 (q, MMTr OCH₃), 35,99 (t, N – CH₂), 15,62 (t, CH₂CN).

60

65

N³-Cyanoethyl-2',3'-O-dimethyl-5'-O-monomethoxytrityluridin 29a

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 8,12 (d, J = 7,7 Hz, 1H; 6 – H), 7,45 – 7,21 (m, 12H; MMTr), 6,87 (d, J = 9,3 Hz, 2H; MMTr), 5,95 (s, 1H; 1' – H), 5,35 (d, J = 7,7 Hz, 1H; 5 – H), 4,32 – 3,88 (m, 5H; 2' – H 3' – H 4' – H, N – CH₂), 3,8 (s, 3H; MMTr OCH₃), 3,66 (s, 3H; OCH₃), 3,6 – 3,39 (m, 2H; 5' – CH₂), 3,46 (s, 3H; OCH₃), 2,78 (t, J = 7 Hz, 2H;

65

DE 41 10 085 A1

CH_2CN).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): $\delta = 161,83$ (s, 4—C), 158,60 (s, arom., C—OCH₃), 150,07 (s, 2—C), 143,67/143,36 (arom.), 138,40 (d, 6—C), 134,32/130,2/128,15/128,10 127,82/127,07 (arom.), 116,95 (s, CN), 113,1 (arom.), 101,07 (d, 5—C), 88,25 d, 1'—C), 87,1 (s, C(Ph)3), 81,75 d, 4'—C), 80,69 (d, 2'—C), 76,36 (d, 3'—C), 60,83 (t, 5'—CH₂), 58,31/58,07 (2q, 2'/3'—OCH₃), 55,02 (q, MMTr OCH₃), 35,95 (t, N—CH₂), 15,86 (t, CH₂CN).

b) 500 mg (0,88 mmol) 24a wurden in 7 ml Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur mit insgesamt 10 ml Diazomethanlösung versetzt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und nach 4 Stunden zwischen Dichlormethan und Natriumbicarbonatlösung verteilt. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet, filtriert und eingedampft. Nach säulenchromatographischer Reinigung (60 g Kieselgel, Eluens: Diethylether) wurden 330 mg (64%) 25a und 100 mg (19%) 28a erhalten.

2'-O-Methyl-5'-O-monomethoxytrityluridin 26a

100 mg (0,17 mmol) 25a wurden in Dichlormethan mit 38 mg (0,34 mmol) t-Kaliumbutylat versetzt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch zwischen Dichlormethan und Natriumbicarbonatlösung verteilt, die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (4 g Kieselgel, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 9/1) gereinigt. Es wurden 80 mg (89%) 26a, weißer Schaum erhalten. DC: Dichlormethan/Aceton = 3/2, $R_f = 0,41$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): $\delta = 9,2$ (s br, 1H; NH), 8,02 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 6—H), 7,4—7,25 (m, 12H; MMTr), 6,85 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H; MMTr), 5,97 (s, 1H; 1'—H), 5,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 5—H), 4,5* (dd, $J_1 = 5,3$ Hz, $J_2 = 9,3$ Hz, 1H; 3'—H), 4,0* (d, $J = 8$ Hz, 1H; 4'—H), 3,8 (s, 4H; MMTr OCH₃, 2'—H), 3,65 (s, 3H; 2'—OCH₃), 3,56 (d, $J = 2$ Hz, 2H; 5'—CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): $\delta = 163,76$ (s, 4—C), 158,55 (s, arom., C—OCH₃), 150,19 (s, 2—C), 143,75/143,42 (arom.) 139,85 (d, 6—C), 134,4/130,25/128,22/128,12/127,78/127,05/113,08 (arom.), 101,87 (d, 5—C), 87,06 (s, C—(Ph)3), 86,88 (d, 1'—C), 83,8 (d, 2'—C), 82,82 (d, 4'—C), 68,15 (d, 3'—C), 61,07 (t, 5'—CH₂), 58,43 (q, OCH₃), 54,98 (q, MMTr OCH₃).

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyluridin 26b

24 g (0,042 mol) 24b wurden analog zu 25a (Ansatz Methyljodidalkylierung) mit 1,6 g (42 mmol) 60% Natriumhydridsuspension (gewaschen mit wasserfreiem n-Hexan) versetzt und 1h bei -45°C gerührt. Nun wurden 10,53 g (0,068 mol) Ethyljodid zugegeben und im weiteren wie bei 25a vorgegangen. SC (Kieselgel feinst, Eluens Dichlormethan/Aceton = 12/1) ergab 6,0 g 25b (verunreinigt mit Regiosomeren) als weißem Schaum. Dieser wurde wie bei 26a getrocknet, in 60 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst, mit 4,2 g (18,2 mmol) Kalium-t-butylat versetzt und in gleicher Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde durch SC (Kieselgel feinst, Eluens: Dichlormethan/Aceton = 9/1) gereinigt, wobei 4,1 g (17%) 26b als graubrauner Schaum erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta = 9,30$ (s br, 1H; NH), 7,79 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 6—H), 7,5—7,08 (m, 9H; DMTr), 6,89 (d, $J = 8,9$ Hz, 4H; DMTr), 5,80 (s, 1H 1'—H), 5,24 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 5—H), 4,30* (m, 1H; 2'—H), 3,94* (m, 2H; 3'—H, 4'—H), 3,75 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,45—3,20 (m, 4H; O—CH₂—CH₃, 5'—CH₂), 1,21 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H; O—CH₂—CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62,5 MHz): $\delta = 163,95$ (s, 4—C), 159,63 (s, arom.), 159,61 (s, C—OCH₃), 151,97 (s, 2—C), 145,69 (arom.), 141,10 (d, 6—C), 136,52/136,26/130,97/130,95/128,91/128,82/127,86 (arom.), 102,29 (d, 5—C), 88,52* (s, C—(Ph)3), 87,39* (d, 1'—C), 83,87 (d, 4'—C), 82,44 (d, 2'—C), 69,50 (d, 3'—C), 67,01 (t, O—CH₂—CH₃), 62,96 (t, 5'—CH₂), 55,81 (q, DMTr OCH₃), 15,41 (q, O—CH₂—CH₃).

2'-O-Methyluridin 30a

8 g (14,3 mmol) 26a wurden in 100 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur mit 5 ml einer 10%igen methanolischen Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eingedampft und der Rückstand zwischen Diethylether und Wasser verteilt, die organische Phase noch zweimal mit Wasser extrahiert, die vereinigten wäßrigen Phasen eingedampft und das Produkt mehrmals mit Benzol und Pyridin abgeschleppt. Es wurden 3,27 g (93%) 30a als weißer Schaum (DC: Dichlormethan/Methanol = 3/1, $R_f = 0,37$) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 90 MHz): $\delta = 8,00$ (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 6—H), 6,0 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H; 1'—H), 5,78 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H; 5—H), 5,08 (s br, 3H; 5'—OH), 3'—OH, NH), 4,25 (ABX-System, $J_{AB} = 4,5$ Hz, $J_{AX} = 5,4$ Hz, 1H; 2'—H), 4,1—3,85 (m, 2H; 3'—H, 4'—H), 3,74 (m, 2H; 5'—H), 3,30 (s, 3H; 2'—OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 22,5 MHz): $\delta = 163,19$ (s, 4—C), 150,62 (s, 2—C), 140,55 (d, 6—C), 101,91 (d, 5—C), 86,15 (d, 1'—C), 85,33 (d, 4'—C), 82,9 (d, 2'—C), 68,43 (d, 3'—C), 60,57 (t, 5'—CH₂), 57,60 (q, OCH₃).

2'-O-n-Butyl-5'-O-MMT-N-cyanoethyluridin

Ansatz:

2 g (3,51 mmol) 5'-O-MMT-N-Cyanoethyl-uridin

150 mg (1,1 Äquivalente) NaH

0,67 ml (1,8 Äquivalente) n-Butylbromid

2 g (3,51 mmol) 5'-O-MMT-N-Cyanoethyl-uridin wurde dreimal mit Benzol abgeschleppt, in absolutem DMF gelöst und auf minus 60°C abgekühlt. Dann wurde 150 mg einer 60% NaH-Suspension (1,1 Äquivalente)

zugegeben und 30 Minuten bei -50°C gerührt. Nun wurde zu der Reaktionslösung langsam 0,52 ml (1,4 Äquivalente) Butylbromid zugetropft. Nach 20 Minuten wurde die Temperatur langsam (innerhalb von drei Stunden) auf 10°C angehoben. Die Reaktion wurde mittels DC-Chromatographie verfolgt. Es wurden noch 0,15 ml (0,4 Äquivalente) Butylbromid zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion abgebrochen wurde. Die Lösung wurde mit ca. 1 g NH_4Cl versetzt und am Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen Dichlormethan und Natriumhydrogencarbonat verteilt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wurde gereinigt:

5

Säule: 100 g Kieselgel, Laufmittel: Dichlormethan

Ausbeute: 300 mg rein (15% der Theorie)

10

DC-Laufmittel: Dichlormethan : Aceton 9 : 1)

$R_f = 0,65$ (2'-O-butyl), $R_f = 0,44$ (3'-O-butyl).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8,05 (d, H6); 7,5–7,2 (m, MMT); 6,9–6,7 (m, MMT); 5,95 (d, H1'); 5,3 (d, H5), 4,6–3,6 (m, H2', H3', H4', OCH_2 , NCH_2); 3,8 (S, OCH_3 , MMT); 3,55 (d, C5'), 2,7 (t, CH_2CN), 1,8–1,2 (m, Butyl- CH_2CH_2 4H); 0,9 (t, CH_3 -Butyl).

15

$^1\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 161 (=C4); 158,8 (MMT); 150,3 (C2); 143,9 (MMT); 143,5 (MMT); 138,5 (C6); 134,6, 130,4, 128,4, 127,8, 127,3 (MMT), 117,0 (CN); 113,3 (MMT), 101,3 (C5); 88,1 (MMT); 87,4 (C1'); 83,3 (C4'); 62,4 (C2'); 70,8 (2'- OCH_2); 68,2 (C3'); 61,1 (C5'); 55,2 ($\text{O}-\text{CH}_3$ -MMT); 36,2 ($\text{N}-\text{CH}_2$); 31,6 (Butyl- β -CH₂); 19,2 (Butyl-CH₂); 16,1 (CH₂CH); 13,8 (CH₃ Butyl). Chemische Verschiebung in ppm.

Beispiele für die Phosphorylierung

20

Nach dem Trocknen durch Abschleppen mit Pyridin, Toluol und THF werden 1–3 mmol des geschützten Nukleosids 3a, 3a', 3b, 9a, 9b, 16a, 16b, 18a, 26a, 26b in 25 ml THF (im Fall von 3a, 16a in trockenem DCM) gelöst. Unter Stickstoff wird die Lösung mit 2–3,6 moleq. N,N-Diisopropylethylamin (Hünig's Base) und anschließend innert 5 Min. mit 1,2 bis 2,4 moleq. 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylmonochlorphosphoramidit bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wird dann während 2 Stunden gerührt und durch TLC beobachtet (das Phosphoramidit gibt mit Ninhydrinreagens eine gelbe Farbe). Wenn dann immer noch Ausgangsmaterial vorhanden ist, werden zusätzliche 0,3 moleq. Phosphorylierungsmittel zugesetzt. Das überschüssige Reagens wird danach durch die Zugabe von 3–5 moleq. Isopropanol, sec.-Butanol oder Methanol gequenched und die Reaktionsmischung wird während einer weiteren Stunde gerührt. Durch Verdampfen im Vakuum wird das Reaktionsgemisch eingeengt und dann mit entgastem Ethylacetat (50 ml) versetzt. Die Lösung wird zweimal mit entgaster einmolarer wässriger Natriumbicarbonatlösung (100 ml) unter Argon bei 0°C extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit Toluol abgeschleppt und in 3–5 ml entgastem Toluol (im Fall von Pyrimidinen) oder Ethylacetat (im Fall von Purinen) gelöst. Die Lösung wird tropfenweise trockenem Petrolether (200 ml, Siedebereich 40–60°C) zugesetzt und der farblose Niederschlag wird durch Filtrieren unter Stickstoff abgetrennt. Nach sorgfältigem Waschen mit Hexan wird das Phosphoramidit im Vakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril zu einer 100-mM-Lösung gelöst, die direkt für die Oligonukleotidsynthese verwendet wird. Der Gehalt an mitgefälltem Cyanoethyl-N,N-diisopropyl-H-phosphonat 31 wird durch ^1H und ^{31}p -NMR erfaßt, stört jedoch die Kupplungseffizienz nicht (siehe folgende Tabelle).

25

30

35

40

Tabelle: Phosphorylierung von geschützten 2'-Methyl- und 2'-Ethynukleosiden

No.	mmol Nucleotid	Amin equiv.	Chloro- phos- phin	Alkohol für Quench	Ausbeute	31 Gehalt	
2'-OCH ₃ C	MMTr 4a'	3,16	3	1,2	i-PrOH	71%	3%
2'-OCH ₃ C	DMTr 4a	5,12	2	1,4	MeOH	94%	n. d.
2'-OEt C	DMTr 4b	2,95	3	1,6	s-BuOH	96%	7%
2'-OCH ₃ A	DMTr 10a	1,30	3	1,5	i-PrOH	93%	1%
2'-OEt A	DMTr 10b	0,68	2	1,5	i-PrOH	66%	2%
2'-OCH ₃ G ^{NPE}	DMTr 17a	0,28	2	1,4	MeOH	92%	n. d.
2'-OEt G ^{NPE}	DMTr 17b	1,12	3	2,1	s-BuOH	93%	2%
2'-OCH ₃ G	DMTr 17a'	1,28	3,6	2,4	i-PrOH	96%	2%
2'-OCH ₃ U	MMTr 27a	1,30	3	1,5	i-PrOH	88%	3%
2'-OEt U	DMTr 27b	2,61	3	1,6	s-BuOH	97%	2%

45

$\text{N}^4\text{-Benzoyl-5}'\text{-O-dimethoxytrityl-2}'\text{-O-methylcytidin-3}'\text{-O-[(2-cyanomethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit]}$ 4a

60

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): $\delta = 8,6, 8,5$ (2d, $J = 7,5$ Hz, 1H; 6—H, 2 diast.), 7,93–6,65 (m, 19H; NH, DMTr), 7,03, 6,95 (2d, $J = 7,5$ Hz, 1H; 5—H, 2 diast.), 6,05, 6,01 (2d, 1H; 1'—H, 2 diast.), 4,72–4,03 (m, 2H; 2'—H, 3'—H), 3,94 (m, 1H; 4'—H), 3,94–3,3 (m, 4H; P—O—CH₂, 2 × (CH(CH₃)₂), 3,78 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,65 (s, 3H; 2'—OCH₃), 3,53 (m, 2H; 5'—CH₂), 2,68, 2,37 (2t, $J = 7,3$ Hz, 2H; CH₂CN, 2 diast.), 1,4–1,0 (12H; 2 × CH(CH₃)₂).

65

DE 41 10 085 A1

N⁴-Benzoyl-2'-O-methyl-5'-O-monomethoxytritylcytidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramido] 4a'

TLC: 2 Diastereomere, R_f = 0,69, 0,55 (Ethylacetat)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 3% 31 [d, 6,87 ppm, J = 640 Hz, P – H; t, 2,75 ppm, J = 6 Hz, –CH₂CN]): 9,2 (br s, 1H; NH), 8,51, 8,40 (2d, J = 8 Hz, 1H; 6 – H, 2 diast.), 7,93 (m, 2H; Bz), 7,7 – 7,15 (m, 15H; MMTr, Bz), 7,06, 7,04 (2d, J = 8 Hz, 1H; 5 – H, 2 diast.), 6,9 (m, 2H; MMTr 3,5 – H), 5,92 (d, J = 5 Hz, 1H; 1' – H), 4,60, 4,46 (2m, 1H; 3' – H, 2 diast.), 4,18 (m, 2H; 4' – H), 3,96 (2d, 1H; 2' – H), 3,8 – 3,3 (m, 12H; 5' – CH₂, O – CH₂ – CH₂CN, 2 × CH – (CH₃)₂, MMTr OCH₃ [3,79; s, 3H], 2' – OCH₃ [3,57; s, 3H]), 2,64, 2,51 (2t, J = 6 Hz; O – CH₂ – CH₂CN 2 diast.), 1,3 – 0,8 (m, 12H; i-Pr CH₃, 2 diast.)

³¹P-NMR (101,26 MHz, CD₃CN): 149,75, 149,05 (2 diast.); 31: 13,71

N⁴-Benzoyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-ethylcytidin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] 4b

TLC: 2 Diastereomere R_f = 0,51, 0,61 (DCM/Ethylacetat 1 : 1)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1.1 Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 8% Hexan [m, 0,86 ppm] und 7% 31 [d, 6,87 ppm, J = 635 Hz, P – H; t, 2,76 ppm, J = 6 Hz, –CH₂CN]): 9,25 (s, br, 1H; 4 – NH – Bz), 8,54, 8,44 (2d, J = 8 Hz, 1H; 6 – H) 2 diast.), 7,95 (d, J = 8 Hz, 2H; Bz 2,6 – H), 7,7 – 7,2 (m, 12H; DMTr, Bz 3,4,5 – H), 7,06, 7,03 (2d, J = 8 Hz, 1H; 5 – H, 2 diast.), 6,90 (m 4H; DMTr 3,5 – H), 5,89 (d, J = 4 Hz, 1H; 1' – H), 4,61, 4,47 (2m, 1H; 3' – H, 2 diast.), 4,19* (m, 1H; 4' – H), 4,06* (m 1H; 2' – H), 4,0 – 3,4 (m, 14H; DMTr 2 × –OCH₃ [3,79 s, 6H, 2' – OCH₂ –, 2 × N – CH, P – O – CH₂ –, 5' – CH₂]), 2,64, 2,52 (2t, J = 6 Hz, 2H; –CH₂CN, 2 diast.), 1,3 – 1,0 (m, 15H; 2' – OCH₂CH₃, 2 × CH(CH₃)₂)

³¹P-NMR (CD₃CN, 101,26 MHz): 149,64, 148,77 (2 diast.); 31: 13,72

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methyl-N⁶-(phenoxyacetyl)-adenosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] 10a

TLC: 2 Diastereomere R_f = 0,63, 0,56 (DCM/ethylacetat 1 : 1)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 1% 31 [d, 6,87 ppm, J = 640 Hz, P – H; t, 2,75 ppm, J = 6 Hz, –CH₂CN]): 9,3 (br s, 1H; NH), 8,59, 8,58 (2s, 1H; 2 – H, 2 diast.), 8,31, 8,29 (2s, 1H; 8 – H, 2 diast.), 7,45 – 7,15 (m, 11H; MMTr, PhOAc 2,6 – H), 7,03 (m, 3H; PhOAc 3,4,5 – H), 6,82 (m, 4H; DMTr 3,5 – H), 6,11 (d, J = 5 Hz, 1H; 1' – H), 4,98 (s, 2H; PhOAc – CH₂), 4,80 (m, 1H; 2' – H), 4,69 (m, 1H; 3' – H), 4,30 (m, 1H; 4' – H), 3,8 – 3,3 (m, 15H; 5' – CH₂, O – CH₂ – CH₂CN, 2 × CH – (CH₃)₂, 2 × DMTr OCH₃ [3,74; s, 6H], 2' – OCH₃ [3,46, 3,44; 2s, 3H, 2 diast.]), 2,66, 2,51 (2t, J = 6 Hz; O – CH₂ – CH₂CN, 2 diast.), 1,3 – 0,8 (m, 12H; i-Pr CH₃, 2 diast.)

³¹P-NMR (101,26 MHz, CD₃CN): 149,88, 149,57 (2 diast.); 31: 13,71

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyl-N⁶-(phenoxyacetyl)-adenosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] 10b

TLC: 2 Diastereomere R_f = 0,74, 0,81 (DCM/Ethylacetat 1 : 1)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 1,5% 31 [d, 6,87 ppm, J = 635 Hz, P – H; t, 2,75 ppm, J = 6 Hz, –CH₂CN]: 9,3 (s br, N6 – NH), 8,59, 8,57 (2s, 1H; 2 – H, 2 diast.), 8,30, 8,28 (2s, 1H; 8 – H, 2 diast.), 7,5 – 7,2 (m, 11H; DMTr, PhOAc 2,6 – H), 7,03 (m, 3H, PhOAc 3,4,5 – H), 6,81 (m, 4H; DMTr, 3,5 – H), 6,10 (d, J = 4,5 Hz, 1H; 1' – H), 4,97 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,78 (m, 1H; 2' – H), 4,71 (m, 1H; 3' – H), 4,30 (m, 1H; 4' – H), 3,9 – 3,5 (m, 12H; DMTr 2 × –OCH₃ [3,75 s, 6H], 2' – OCH₂ –, 2 × N – CH, P – O – CH₂ –), 3,38 (m, 2H; 5' – CH₂), 2,67, 2,48 (2t, J = 6 Hz, 2H; –CH₂CN, 2 diast.), 1,18, 1,16 (2d, J = 7 Hz, 12H; 2 × CH(CH₃)₂), 1,10 (t, J = 7 Hz, 3H; 2' – OCH₂CH₃)

³¹P-NMR (CD₃CN, 101,26 MHz): 149,71, 149,32 (2 diast.); 31: 13,72

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)-ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin-3'-O-[(2-cyanomethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] 17a

¹H-NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ = 8,5 (s br, 1H; NH), 8,12 (d, J = 9 Hz, 2H; NPE arom.), 8,02, 7,96 (2s, 1H; 8 – H, 2 diast.), 7,5 (d, J = 9 Hz, 2H; NPE arom.), 7,5 – 6,6 (m, 18H; DMTr, PhOAc), 6,1 (m, 1H; 1' – H), 4,85 (t, J = 6,4 Hz, 2H; NPE O – CH₂), 4,68 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,7 – 4,0 (m, 3H; 2' – H, 3' – H, 4' – H), 4,0 – 3,18 (m, 8H; 5' – CH₂, NPE CH₂ – Ph, 2 × CHCCH₃)₂, P – O – CH₂), 3,76 (s, 6H; DMTr OCH₃), 3,5 (s, 3H; 2' – OCH₃), 2,62, 2,45 (2t, J = 6,3 Hz, CH₂CN, 2 diast.), 1,17, 1,04 (2d, J = 7,2 Hz, 12H; 2 × CH(CH₃)₂, 2 diast.)

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)-ethyl]-N²-(phenoxyacetyl)guanosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] 17b

TLC: R_f = 0,87 (DCM/Ethylacetat 1 : 1)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 2% Hexan [m, 0,86 ppm] und 2% 31 [d, 6,87 ppm, J = 635 Hz, P – H; t, 2,75 ppm, J = 6 Hz, –CH₂CN]: 8,79, 8,77 (2s, 1H; 2 – NH, 2 diast.), 8,14 (d, J = 9 Hz, 2H; PhNO₂ 3,5 – H), 8,07, 8,04 (2s, 1H; 8 – H, 2 diast.), 7,57 (d, J = 9 Hz, 2H; PhNO₂ 2,6 – H), 7,45 – 7,15 (m, 11H; DMTr, PhOAc, 2,6 – H), 6,99 (m, 3H, PhOAc 3,4,5 – H), 6,78 (m, 4H; DMTr 3,5 – H), 6,02 (d, J = 5 Hz, 1H; 1' – H), 4,91 (s, 2H; PhOAc CH₂), 4,84 (t, J = 7 Hz, 2H; O⁶ – CH₂), 4,73 (m, 1H; 2' – H), 4,58 (m, 1H; 3' – H), 4,28 (m,

DE 41 10 085 A1

1H; 4'-H), 3,8–3,25 (m, 16H; DMTr 2 × –OCH₃ [3,73 s, 6H], 2'-OCH₂–, 2 × N–CH, P–O–CH₂–, 5'-CH₂, NPE CH₂Ph[3,32 t, J=7 Hz, 2H], 2,63, 2,46 (2t, J=6 Hz, 2H; –CH₂CN 2 diast.), 1,2–1,0 (m, 15H; 2'-OCH₂CH₃, 2 × CH(CH₃)₂]
³¹P-NMR (CD₃CN, 101,26 MHz): 149,71, 149,49 (2 diast.); 31: 13,72

5

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-methyl-N²-(phenoxyacetyl)-guanosin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] 18a

TLC: R_f=0,5 (Aceton/DCM 3 : 7)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 :1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 2% O-2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylamino-H-phosphonat 31 [d, 6,87 ppm, J=640 Hz, P–H; t, 2,75 ppm, J=6 Hz, –CH₂CN]): 7,89, 7,86 (2s, 1H; 8–H, 2 diast.), 7,5–7,1 (m, 11H; DMTr, PhOAc 2,6–H), 7,1–7,0 (m, 3H; PhOAc 3,4,5–H), 6,85–8,7 (m, 4H; DMTr 3,5–H), 5,94 (m, 1H; 1'-H), 4,74 (s, 2H; PhOAc–CH₂), 4,55–4,45 (m, 2H; 2', 3'–H), 4,28 (m, 1H; 4'-H), 3,8–3,3 (m, 15H; 2 × DMTr OCH₃ [3,73; s, 6H], 5'-CH₂, O–CH₂–CH₂CN, 2 × CH–(CH₃)₂, 2'-OCH₃ [2 diast., 3,44, 3,42; 2s, 3H]), 2,66, 2,47 (2t, J=6 Hz; O–CH₂–CH₂CN, 2 diast.), 1,3–1,0 (m, 12H; i-Pr CH₃, 2 diast.)
³¹P-NMR (101,26 MHz, CD₃CN): 149,97, 149,86 (2 diast.); O-(2-Cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-amino-H-phosphonat 31: 13,71

10

15

2'-O-Methyl-5'-O-monomethoxytrityluridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] 27a

20

TLC: 2 diastereomers R_f=0,76, 0,70 (Ethylacetat/DCM 1 : 1)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 :1-Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 3% 31 [d, 6,87 ppm, J=638 Hz, P–H; t, 2,75 ppm, J=6 Hz, –CH₂CN]): 8,9 (br s, 1H; NH), 7,82, 7,69 (2d, J=8 Hz, 1H; 6–H, 2 diast.), 7,5–7,2 (m, 12H, MMTr), 6,9 (m, 2H; MMTr), 5,87 (d, J=5 Hz, 1H; 1'-H), 5,21, 5,18 (2d, J=8 Hz, 1H; 5–H, 2 diast.), 4,52 4,42 (2m, 1H; 3'–H, 2 diast.), 4,12 (m, 1H; 4'-H), 3,93 (m, 1H; 2'–H), 3,85–3,3 (m, 12H; 5'-CH₂, O–CH₂–CH₂CN, 2 × CH–(CH₃)₂, MMTr OCH₃ [3,77; s, 3H], 2'-OCH₃ [3,50, 3,48; 2s, 3H, 2 diast.]), 2,67, 2,51 (2t, J=6 Hz; O–CH₂–CH₂CN 2 diast.), 1,3–1,0 (m, 12H; i-Pr CH₃, 2 diast.)
³¹P-NMR (101,26 MHz, CD₃CN): 149,75, 149,41 (2 diast.); 31: 13,70

25

35

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-O-ethyluridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] 27b

30

TLC: R_f=0,83 (Ethylacetat)

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN; 1 : 1.1 Mischung von 2 Diastereomeren, das Amidit enthält 5% Hexan [m, 0,86 ppm] und 1,6% 31 [d, 6,86 ppm, J=635 Hz, P–H; t, 2,75 ppm, J=6 Hz, –CH₂CN]: 9,0 (s, br, 1H; 3–NH), 7,82, 7,73 (2d, J=8 Hz, 1H; 6–H, 2 diast.), 7,5–7,2 (m, 9H; DMTr), 6,88 (m, 4H; DMTr 3,5–H), 5,85, 5,83 (2d, J=4 Hz, 2 diast.), 4,50, 4,40 (2m, 1H; 3'–H, 2 diast.), 4,14* (m, 1H; 4'-H), 4,05* (m, 1H; 2'–H), 3,8–3,5 (m, 12H; DMTr 2 × –OCH₃ [3,77 s, 6H], 2'-OCH₂–, 2 × N–CH, P–O–CH₂–), 3,41 (m, 2H; 5'-CH₂), 2,67, 2,52 (2t, J=6 Hz, 2H; –CH₂CN, 2 diast.), 1,25–1,0 (m, 15H; 2'-OCH₂CH₃, 2 × CH(CH₃)₂)
³¹P-NMR (CD₃CN, 101,26 MHz): 149,57, 149,18 (2 diast.); 31: 13,72

35

40

Beispiele für modifizierte Oligoribonukleotide

3'-Aminomodifizierte 2'-O-Methyloligoribonukleotide

Die am 3'-Ende mit (3-Amino-2-hydroxypropyl)phosphat modifizierten 19mer 2'-O-methylierten Oligoribonukleotide können mit einem ABI 380 B DNA-Synthesizer (Applied Biosystems) synthetisiert werden, wobei ein modifizierter LCAA-CPG (controlled pore glass) Feststoffträger verwendet wird, der 1-O-DMTr, 3-N-[Fluorenyl(methoxycarbonyl)]aminopropandiolgruppen (3'-Amin-ON CPG, Clontech) trägt. 2'-O-Methylnukleosid-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidite mit folgenden Schutzgruppen werden verwendet:

45

A:
N⁶-Phenoxyacetyl
5'-O-DMTr

50

C:
N⁴-Benzoyl
5'-O-MMTr

55

G:
N²-Phenoxyacetyl
5'-O-DMTr

60

U:
5'-O-MMTr

65

Standard DNA-Syntheseverfahren mit erhöhter Kopplungszeit (5 Min. statt 3 Min.) wird verwendet. Das Oligonukleotid wird durch Behandeln mit 25%iger wässriger NH₄OH-Lösung (15 h bei 55°C) von Schutzgruppen befreit und vom Träger getrennt. Nach der abschließenden De-Tritylation wird das rohe Oligonukleotid durch Fällen mit Ethanol gereinigt.

65

Quantitative Bestimmung:

Die Oligonukleotide werden durch die UV-Absorption bei 260 nm quantitativ bestimmt, falls erforderlich wird

der Wert durch Subtraktion der entsprechenden UV-Absorption des FITC, Dithiopyridin oder Puffers bei 260 nm korrigiert. Der Wert der Dithiopyridin-Linker in modifizierter Oligonukleotiden wird nach Reduktion einer Teilmenge mit Dithiotreitol durch Absorptionsmessung von freigesetztem Pyridin-2-thion bei 343 nm (molarer Extinktionskoeffizient $8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

5 Der Fluoresceingehalt wird spektrophotometrisch durch Absorption bei 495 nm bestimmt. Der Gehalt an PMDBD (Heinzerbase, Fluka) wird durch UV-Absorption bei 219 nm bestimmt; 1 μmol (als Hydrochlorid, in Wasser) entspricht ungefähr 16,3 AU₂₁₉.

3'-Fluoreseinmodifizierte 2'-O-Methyloligoribonukleotide

10 Markieren mit FITC kann ähnlich der für 5'-aminomodifizierte Oligodeoxyribonukleotide beschriebenen Methode (Agrawal, S., Christodoulou, C., and Gait, M. J., (1986) Nucleic Acids Res. 14, 6227 – 45) erfolgen. Eine Lösung von 10,4 AU₂₆₀ (ca. 350 μg ; 52 nmol) 2'-O-Methyloligoribonukleotid 19mer mit der Sequenz 5'-GAG CAC ACU UCA UGC AGUG-3'-modifiziert mit (3-Amino-2-hydroxypropyl)phosphat am 3'-Ende in 100 μl Wasser wird mit einer Lösung von 2,8 mg (7,2 μmol , 150 Äquivalente) Fluoreszeinisothiocyanat (Sigma) in 300 μl 1M wäßriger Natriumbicarbonatlösung (pH 8,5) für 4 h bei Raumtemperatur behandelt. Die Mischung wird einer Gelfiltration unterworfen (Sephadex G 25-PD 10, Pharmacia) mit Wasser als Eluent. Das erste Eluat, das Oligoribonukleotidfraktionen enthält, wird im Vakuum (eventuell mit Speedvac, Savant) eingedampft, der Rückstand wird in 200 μl eines 100 mM Triethylammoniumacetatpuffers (pH 7) aufgenommen. Das Auftrennen erfolgt durch RP-HPLC (Nukleosil RP-18, 250 \times 4 mm;

Puffer A: 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 7
Puffer B: Acetonitril, Gradientenelution: 0 – 50 Min., 0 – 50% B, Nachweis durch UV-Absorption bei 260 nm und Fluoreszenznachweis bei 490 nm (Excitation, 520 nm Emission) ergibt 3,3 AU₂₆₀ (32%) Oligoribonukleotid in nicht FITC-modifizierter Form bei einer Gradientenkonzentration von ungefähr 18 – 19% Acetonitril, und 4,1 AU₂₆₀ (auch 1,1 AU₄₉₆; der AU₂₆₀-Wert entspricht ungefähr 3,75 AU₂₆₀ unmarkierten Oligoribonukleotid, 36%) an fluoresceinmodifiziertem Oligoribonukleotid bei einer Gradientenkonzentration von 19 – 20,5% Acetonitril.

Synthese von thiocholesterinmodifizierten Oligoribonukleotiden

30 a) Modifikation mit Dithiopyridingruppen:
Eine Lösung von 14,1 AU₂₆₀ (ungefähr 450 μg ; 67 nmol) von 2-O-Methyloligoribonukleotid 19mer mit der Sequenz 5'-CUA AAA GAG CUG UAA CACU-3' modifiziert mit (3-Amino-2-hydroxypropyl)phosphat am 3'-Ende, in 0,75 ml 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,9) wird mit einer Lösung von 4,2 mg (13,4 μmol , 200 Äquivalente) N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP, Pharmacia) in 300 μl Ethanol während 4 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die Mischung wird einer Gelfiltration unterworfen (Sephadex G25-PD10, Pharmacia) mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,3) als Eluent. Das erste Eluat, das Oligoribonukleotid enthaltende Fraktionen enthält, wird im Vakuum eingedampft (Speedvac, Savant), aufgelöst in 200 μl Wasser, und weiter durch Reverse-Phase-HPLC gereinigt. (Nukleosil RP-18, 250 – 4 mm;
Puffer A: 100 mM Triethylammoniumacetat, pH 6,5;
Puffer B: Acetonitril.
Gradientenelution: 0 – 40 Min., 0 – 40% B) ergibt 12,2 AU₂₆₀ Oligoribonukleotid (entspricht etwa 11,9 AU₂₆₀ (57 nmol) der Ausgangsverbindung, 85%) modifiziert mit ungefähr 52 nmol Dithiopyridingruppen (nach einer UV-Bestimmung für Pyridin (1H)2-thion, freigesetzt von einer Teilmenge eines Musters durch Dithiotreitolbehandlung und AU-Wert bei 343 nm).

45 b) PMDBD-Salzbildung: Eine wäßrige Lösung von 8,1 AU₂₆₀ (ungefähr 255 μg , 37 nmol) von 2'-O-methyliertem 19mer Oligoribonukleotid, das am 3'-Ende mit Pyridyldithiogruppen modifiziert ist (ungefähr 35 nmol nach UV-Bestimmung) in 250 μl Wasser wird mit 250 μl einer Lösung von 4 mg PMDBD-Carbonat (PMDBD): 3,3,6,9,9-Pentamethyl-2,10-diazabicyclo[4.4.0]dec-1-en, Heinzer Base, Fluka, Heinzer, F., Soukup, M., und Eschenmoser, A. (1978) Helv. Chim. Acta 61, 2851 – 74) in 50% wäßrigem Methanol behandelt, danach mit Wasser auf ein Volumen von 3 ml verdünnt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in 1 ml Methanol/Wasser (1 : 4) gelöst und einer Gelfiltration unterworfen (Sephadex G25 PD10: Elution mit Methanol/Wasser 1 : 4). Die Oligoribonukleotid enthaltende Fraktion (7,1 AU₂₆₀, gemäß Absorption des Nukleotids) 15 AU₂₁₉ (vorwiegend gemäß Absorption von etwa 0,65 μmol PMDBD; 88%) wird teilweise im Vakuum eingeengt (Speedvac), um das Methanol zu entfernen, gefriergetrocknet und dann in 1,0 ml Methanol/Dichlormethan (1 : 2) aufgelöst.

55 c) Konjugation mit Thiocholesterin:
Zu der Hälfte der obigen Lösung (0,5 ml, die etwa 16 nmol des Oligoribonukleotids entspricht) werden 200 μl Methanol, 30 μl 180 mM methanolischer PMDBD Trifluoracetatpuffer (pH 9) und 600 μg (1,5 μmol) Thiocholesterin (Sigma) in 300 μl Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wird unter Argon während 20 Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft (Speedvac), der Rückstand in 400 μl Methanol/Chloroform (1 : 1) gelöst und extrahiert (zunächst mit 4 \times 100 μl Wasser, dann weiter mit 4 \times 100 μl Wasser. Die beiden wäßrigen Extrakte (die 1,6 AU₂₆₀ und 0,7 AU₂₆₀ an Oligoribonukleotid enthalten) werden vereinigt und zur Entfernung des Methanols im Vakuum (Speedvac) auf ein Volumen von ungefähr 500 μl eingeengt. Fraktionieren durch Reverse-Phase-HPLC (Nukleosil RP-18, 250 \times 4 mm; Puffer A: 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7, Puffer B: Acetonitril; Gradientenelution: 0 – 50 Min., 0 – 50% B; 50 – 70 Min., 50 – 100% B) ergibt 0,84 AU₂₆₀ (24%) Oligoribonukleotid in nicht-cholesterinmodifizierter Form bei einer Gradientenkonzentration von etwa 25% Acetonitril, und 1,5 AU₂₆₀ (42%) von thiocholesterinmodifiziertem Oligoribonukleotid bei einer Gradientenkonzentration von 55 – 68% Acetonitril.

60 d) In analoger Weise wird ein 2'-O-methyliertes Oligoribonukleotid 19mer, das ein aminomodifiziertes 3'-Ende

enthält, mit der Sequenz 5'-GAG CAC ACU UCA UGC AGVG-3' an Thiocholesterin gebunden. Das durch Pyridylthiopropionat modifizierte Oligoribonukleotid (12 AU₂₆₀; etwa 60 nmol) als PMDBD-Salz wird als Rohprodukt der Umsetzung des aminomodifizierten Oligoribonukleotids mit 200 Äquivalenten von SPDP und Umwandlung zu dem PMDBD-Salz erhalten. Gemäß der Reverse-Phase-HPLC-Analyse enthält das Rohprodukt ungefähr 75% dithiopyridinmodifiziertes Produkt (eluiert bei 20% Acetonitril), verunreinigt mit 25% nicht dithiopyridin-modifiziertem Material (eluiert bei etwa 19% Acetonitril). Das Rohprodukt wird mit 100 Äquivalenten Thiocholesterin behandelt (Umsetzung in einem Totalvolumen von 2 ml Methanol/Dichlormethan (2 : 3), das 5 mM PMDBD-trifluoracetat enthält, pH 8,5). Aufarbeiten und HPLC-Reinigung ergibt 4,7 AU₂₆₀ (etwa 160 µg; 39%) von Oligoribonukleotid in nicht-thiocholesterin modifizierter Form (eluiert bei etwa 18% Acetonitril), und 5,7 AU₂₆₀ (etwa 190 µg; 48%) der thiocholesterinmodifizierten Form (eluiert bei 55–69% Acetonitril).

Fig. A1 und A2

Reduzierende Spaltung des thiocholesterinmodifizierten Oligoribonukleotids: Eine Lösung von 0,1 AU₂₆₀ (46 nmol) thiocholesterinmodifiziertem Oligoribonukleotid (hergestellt gemäß obigem Punkt (d)) in 900 µl 25 mM HEPES-Puffer (pH 7,3) wird auf eine Konzentration von 10 mM Dithiothreitol (durch Zusatz von 1,4 mg DTT) gebracht und unter Argon bei 37°C für 18 Stunden gehalten. Die Analyse durch Reverse-Phase-HPLC (bei Bedingungen wie oben beschrieben worden ist) zeigt vollständige Spaltung des gesamten Oligoribonukleotids. Eine ähnliche reduzierende Spaltung mit β-Mercaptoethanol (BME) als Reduktionsmittel ergibt dasselbe Spaltungsprodukt. Der Peak des neuen Produktes, vermutlich des abgespaltenen thiocholesterinfreien Oligoribonukleotids, eluiert bei einer Gradientenkonzentration von etwa 18% Acetonitril. Die übrigen früheren Eluierungspeaks sind durch das Reduktionsmittel bedingt.

Inkorporierung von thiocholesterinmodifizierten 2'-O-Methyloligoribonukleotiden in Liposomen

Markieren der Oligoribonukleotide

Thiocholesterin-modifiziertes 2'-O-Methyloligoribonukleotid und ein nicht-modifiziertes 2'-O-Methyloligoribonukleotid als Kontrolle werden 5'-³²P-markiert, wobei man einen Inkubationspuffer mit einer minimalen Menge von Reduktionsmittel einsetzt. 1 pmol Oligoribonukleotid wird inkubiert in 10 µl Puffer [50 nM Tris · HCl pH = 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 nM NaCl, 1 mM Dithioerythritol (DTE)] mit 10 Einheiten T4 Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim) und 2 pmol g-³²P-ATP während 30 Minuten bei 37°C. Das markierte Oligoribonukleotid wird dann durch Gelfiltration gereinigt unter Zugabe von 10 pmol unmarkiertem Oligoribonukleotid, um die unspezifische Absorption zu minimieren (Sephadex G-25 (Pharmacia), 1,8 ml Bettvolumen, 50 mM HEPES pH 7,3; der erste radioaktive Peak, der im Durchfluß erscheint, wird gesammelt).

Herstellung von Liposomen

Die Liposomen werden durch REV (reverse phase evaporation) hergestellt. Wäßrige Phase: 175 µl 50 mM HEPES (pH 7,3), 1 mM Calcein, 1 µM 2'-O-Methyl-RNA(thiocholesterin-modifiziert oder nicht-modifiziert als Kontrolle), versehen mit einer Spurmenge von 5'-³²P-markiertem Material. Organische Phase: Lösung von 5 µmol L-α-Lecithin (von Eigelb, vorwiegend Palmitoyloleoyl-phosphatidylcholin; Avanti Polar Lipids) in 600 µl Diethylether (extrahiert mit 50 mM HEPES-Puffer). Die beiden Phasen werden sorgfältig in einer Glasküvette durch Aufwirbeln gemischt und 5 Min. bei 0°C in einem badähnlichen Beschallungsgerät beschallt. Die anfallende stabile Emulsion wird langsam in einem rotierenden Verdampfer unter gelegentlichem Aufwirbeln der Mischung eingedampft. Nach dem vollständigen Entfernen des Diethylethers (etwa 30 Minuten bei 200 mbar) wird die Liposomenlösung nochmals 20 Min. bei 0°C beschallt. Die erhaltene Lösung wird mit 175 µl 50 mM HEPES pH 7,3 verdünnt und bei 2°C gelagert.

Gelfiltration der Liposomen

Die Liposome (eine Teilmenge von 200 µl) werden von uninkorporiertem Material durch Gelfiltration [Sephadex G-75 superfine (Pharmacia), 10 ml Bettvolumen, 50 mM HEPES pH 7,3] getrennt. Fraktionen von 600 µl werden gesammelt und UV-Analyse und Scintillationszählung unterworfen. Die Calcein-Absorption (493 nm) wird für die unspezifische Absorption der Liposome bei 600 nm gemessen. Als Kontrolle wird eine Teilmenge des markierten Oligoribonukleotids, das nicht durch Thiocholesterin modifiziert ist, analog chromatographiert.

Die Effizienz der Einkapselung wird aus der Calceinabsorption, die mit den Liposomfraktionen (in den Fraktionen 4–7) assoziiert ist, und dem nicht-inkorporierten Calcein, das mit den Fraktionen (10–25) mit niedrigem Molekulargewicht eluiert wird, berechnet. Die Inkorporation des Oligoribonukleotids wird bestimmt durch Vergleichen der Radioaktivität der Liposomfraktionen (4–7) mit der gesamten eluierten Radioaktivität im Fall von unmodifizierten Oligoribonukleotiden und der Radioaktivität in den Oligonukleotidfraktionen (8–16, siehe Fig. 13 und 14) im Fall der thiocholesterinmodifizierten Oligoribonukleotide. (Der Wert der Radioaktivität, die mit den Liposomen assoziiert ist, wird korrigiert, um den Wert der unspezifisch inkorporierten ³²P-phosphate oder Nukleotide, die vom Abbau markierter Oligoribonukleotide stammen). Die Verteilung der Radioaktivität ist folgende: unmodifizierte Oligoribonukleotide: Liposome assoziiert 8%, Oligoribonukleotid 31%, Phosphate 61%; thiocholesterin-modifizierte Oligoribonukleotide: Liposome assoziiert 46%; Oligoribonukleotid 19%; Phosphat 34%.

Fig. A3: Gelfiltration der Liposompräparation mit thiocholesterinmodifizierter 2'-O-Methyl-RNA.

Fig. A4: Gelfiltration der Liposompräparation mit unmodifizierter 2'-O-Methyl-RNA. Als Kontrolle wird das 5'-markierte Oligoribonukleotid, (mit unterbrochener Linie) mit einem Maximum in Fraktion 14 gezeigt. Der zweite Peak der Radioaktivität (in den Fraktionen 16–24, mit niedrigem Molekulargewicht) der in der Liposompräparation auftritt (gefüllte Dreiecke in der Zeichnung) ist vermutlich durch den Abbau durch Nuklease oder durch Schaden durch die Beschallung während der Herstellung des Liposoms bedingt.

Die Effizienz der Inkorporation der Oligoribonukleotide in Liposompräparation wird in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

		Liposomeinkapselung von Calcein	RNA
unmodifizierte Oligoribonukleotide		6%	8%
thiocholesterin-modifizierte Oligoribonukleotide		15%	68%

Abbau durch alkalische Phosphatase

Eine Teilmenge (400 µl) der vereinigten Liposomfraktionen, die die thiocholesterin-modifizierten Oligoribonukleotide enthalten (Sephadex G 75, Fraktionen 5+6, in 50 mM HEPES pH 7,3) wird mit 5 Einheiten (aus Kälberdarm, Boehringer Mannheim) während 2 Stunden bei 37°C behandelt.

Als Kontrolle wird dieselbe Menge von Liposomen mit 5 Einheiten Alkaliphosphatase in Gegenwart von 1 µl Triton X-100 für 1 Stunde bei 37°C behandelt. Die Abbauprodukte werden durch Gelfiltration analysiert (Sephadex G-25 PD-10 Säulen) und die erhaltenen Fraktionen (800 µl) werden wie oben beschrieben charakterisiert.

Die Resultate der Gelfiltration der Alkaliphosphataseabbauprodukte werden in Fig. 5 zusammengefaßt:

Das 5'-markierte von etwa der Hälfte des an die Membran assoziierten Oligoribonukleotids wird entfernt ($^{32}\text{PO}_4^{2-}$, Fraktionen 7–12). Dem entspricht, daß die Hälfte des Oligoribonukleotids an der Außenseite der Liposommembran assoziiert ist.

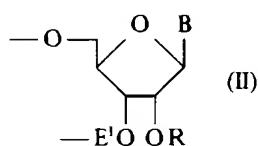
Die Daten der Gelfiltration des Alkaliphosphataseabbaus in Gegenwart von Triton X-100, der den Zusammenbruch des Liposoms verursacht, sind in Fig. A6 zusammengefaßt: alle Oligoribonukleotide sind angreifbar und werden durch Phosphatase abgebaut (die ganze Radioaktivität ist in den Phosphatfraktionen 7–12). Das Calcein tritt ebenfalls aus den Liposomen aus und eluiert als breiter Peak in den Fraktionen 7–17, die niedrige Molekulargewichte zeigen.

Diese Beispiele zeigen deutlich, daß der Grad der Inkorporation der thiocholesterin-modifizierten Oligoribonukleotide wesentlich höher ist als der der unmodifizierten.

Analog den obigen Beispielen können auch mehrere cholesterin- oder thiocholesterin-modifizierte 2'-O-Alkyloligoribonukleotide in Liposomen inkorporiert werden.

Patentansprüche

1. Oligoribonukleotide, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II,



worin

B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
 R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und
 E' ein Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramidat- oder Phosphorthioatrest ist,
 oder deren 2'-OH oder 2'-Desoxyderivat,
 wobei in mindestens einem der Nukleotide R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen ist, und worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine Hydroxylgruppe oder einen Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten.

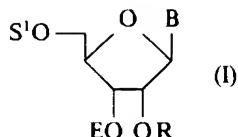
2. Oligoribonukleotid nach Anspruch 1, worin in dem Nukleotid der Formel II B ungeschütztes Adenin, Cytosin, Uracil oder Guanin ist.

3. Oligoribonukleotid nach Anspruch 1 oder 2, worin R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl, ist.

4. Oligoribonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das in Position 3' durch Fluorescein oder Thiocholesterol modifiziert ist.

5. Liposom, in das 3'-Cholesterin oder 3'-thiocholesterinmodifiziertes Oligoribonukleotid, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 3 definiert ist, inkorporiert ist.

6. Alkylierter Ribonukleotidbaustein der allgemeinen Formel I,



5

worin

B ungeschütztes oder geschütztes Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,
R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen bedeutet, E ein Phosphitester-, H-Phosphonat-, Phosphatester-, Phosphat-

10

diester- oder Phosphoramidatrest ist und

S' eine in der Oligonukleotidsynthese übliche Schutzgruppe bedeutet.

7. Ribonukleotidbaustein nach Anspruch 6, worin B N⁶-Benzoyladenin oder N⁶-Phenoxyacetyl-adenin, N⁴-Benzoyl-cytosin, Uracil oder N³-Cyanoethyl-uracil, N²-Benzoyl-guanin, N²-Phenoxyacetyl-guanin oder N²-Phenoxyacetyl-O⁶-nitrophenylethyl-guanin ist.

15

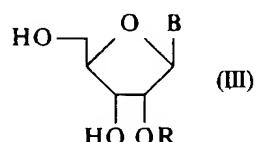
8. Ribonukleotidbaustein nach Anspruch 6 oder 7, worin R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl oder n-Butyl ist.

9. Ribonukleotidbaustein nach einem der Ansprüche 6 bis 8, worin E N,N-Di(1-methylethyl)methoxyphosphoramidit oder N,N-Di(1-methylethyl)-cyanoethoxyphosphoramidit ist.

10. Ribonukleotidbaustein nach einem der Ansprüche 6 bis 9, worin S' Dimethoxytrityl oder Monoethoxytrityl ist.

20

11. Nukleosid der allgemeinen Formel III,



25

worin

B in Position 6 durch Nitrophenylethyl geschütztes Guanin und

R Methyl ist, oder

B ungeschütztes oder geschütztes Cytosin, Inosin, Uracil oder Guanin ist und

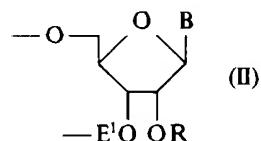
R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen.

35

12. Nukleosid nach Anspruch 11, worin B N⁴-Benzoyl-cytosin, N³-Cyanoethyl-uracil, N²-Phenoxyacetyl-guanin oder N²-Phenoxyacetyl-O⁶-nitrophenylethyl-guanin ist und/oder R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl oder n-Butyl ist.

13. Verfahren zur Herstellung eines Oligoribonukleotides, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II,

40



45

worin

B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,

50

R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und

E' ein Phosphatdiester-, Methylphosphonat-, Phosphoramidat- oder Phosphorthioatrest ist, oder deren 2'-OH oder 2'-Desoxyderivat,

55

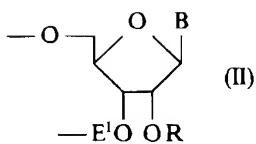
wobei in mindestens einem der Nukleotide R Alkyl mit 2 bis 30 C-Atomen ist, und

worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine Hydroxylgruppe, einen Phosphitester-, H-Phosphonat- oder Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß man die entsprechenden Ribonukleotidbausteine in Gegenwart eines Kopplungsreagenz verknüpft und gewünschtenfalls in das so erhaltene Oligoribonukleotid markierende Gruppen und/oder lipophile Gruppen einführt und gewünschtenfalls Schutzgruppen abspaltet.

60

14. Verfahren zur Herstellung eines Oligoribonukleotides, aufgebaut aus 8 bis 35 Nukleotiden der allgemeinen Formel II

65



worin

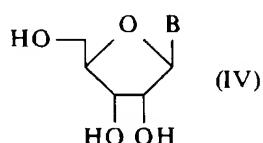
B Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet,

R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen bedeutet, und

E¹ ein Phosphatester-, Phosphatdiester-, Methylphosphonat- oder Phosphorthioatrest ist, oder deren 2'-OH oder 2'-Desoxyderivat, wobei mindestens eines der Nukleotide ein 2'-OR-Nukleotid (II) ist, und

worin die endständigen Gruppen in den Positionen 3' und 5' unabhängig voneinander eine Hydroxylgruppe, oder einen Phosphatesterrest, oder eine durch eine markierende Gruppe oder lipophile Gruppe modifizierte Hydroxylgruppe bedeuten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die entsprechenden Ribonukleotidbausteine durch folgendes mehrstufiges Verfahren herstellt

a) Alkylieren eines Nukleosids der allgemeinen Formel IV,



worin B geschütztes oder ungeschütztes Adenin, Cytosin oder Inosin oder O⁶-geschütztes Guanin oder N³-geschütztes Uracil ist und gewünschtenfalls die Hydroxygruppe in Position 5' geschützt ist, in Gegenwart einer deprotonierenden Base mit einem Alkylierungsmittel der allgemeinen Formel V,

30 R-Z (V)

worin R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen ist und Z für eine nukleophile Abgangsgruppe (z. B. Halogen, Tosyl, Mesyl, Ethylsulfatrest) vorzugsweise Jod steht, umsetzt;

b) Einführen von Schutzgruppen in den Basen und der Position 5' (vorzugsweise Mono- oder Dimethoxytrityl);

c) Phosphorylieren des aus dem Reaktionsgemisch isolierten 2'-O-Alkylnukleosides durch Umsetzen mit einem Phosphorylierungsmittel, vorzugsweise Phosphoramidit;

d) Isolieren des 2'-O-Alkylnukleosid-Phosphoramidits durch Standardverfahren oder vorzugsweise durch Zusatz eines lipophilen Alkohols, vorzugsweise sec-Butanol oder iso-Propanol und Abtrennen des erwünschten 2'-O-Alkylnukleosid-Phosphoramidits durch Extraktion und Ausfällung; und

e) die so erhaltenen Ribonukleotidbausteine (gewünschtenfalls zusammen mit obengenannten 2'-OH und/oder 2'-H-Derivaten) nach Standardmethoden verknüpft, die Schutzgruppen abtrennt und gewünschtenfalls in das so erhaltene Oligonukleotid markierende Gruppen und/oder lipophile Gruppen einführt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin zur Herstellung von Guanin enthaltenden Endprodukten ein Nukleosid (IV) verwendet wird, in dem BO⁶-[2-(4-Nitrophenyl)ethyl]-guanin ist.

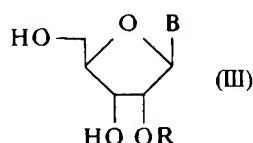
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkylierung in Gegenwart von Natriumhydrid als deprotonierender Base, unter Verwendung von R-Jodid als Alkylierungsmittel (V) bei Temperaturen bis höchstens Raumtemperatur ausgeführt wird.

17. Verfahren zur Herstellung der Liposomen gemäß Anspruch 4, durch Mischen und Beschallen der beiden Phasen, deren eine die Liposomen und deren andere die cholesterin- und/oder thiocholesterinmodifizierten Oligoribonukleotide enthält.

18. Verfahren zur Herstellung eines Ribonukleotidbausteins nach einem der Ansprüche 6 bis 10 durch Umsetzen des entsprechenden Nukleosides mit einem Phosphorylierungsmittel und Isolieren des gegebenenfalls Schutzgruppen enthaltenden Nukleotides.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß Phosphoramidit als Phosphorylierungsmittel verwendet wird und das Isolieren des 2'-O-Alkylnukleosid-phosphoramidits durch Standardverfahren oder vorzugsweise durch Zusatz eines lipophilen Alkohols, vorzugsweise sec-Butanol oder iso-Propanol, Extraktion und Ausfällung erfolgt.

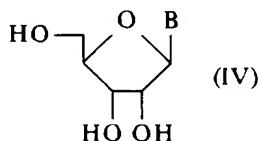
20. Verfahren zur Herstellung eines Nukleosides der allgemeinen Formel III,



DE 41 10 085 A1

worin B geschütztes oder ungeschütztes Cytosin, Uracil, Adenin, Guanin oder Inosin bedeutet und R Alkyl mit 1–30 C-Atomen bedeutet wenn B geschütztes oder ungeschütztes Cytosin, Uracil, Guanin oder Inosin ist und Alkyl mit 2–30 C-Atomen bedeutet, wenn B geschütztes oder ungeschütztes Adenin bedeutet, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Nukleosid der allgemeinen Formel IV

5



10

worin B geschütztes oder ungeschütztes Adenin, Cytosin oder Inosin oder O⁶-geschütztes Guanin oder N³-geschütztes Uracil ist und gewünschtenfalls die Hydroxygruppe in Position 5' geschützt ist, in Gegenwart einer deprotonierenden Base mit einem Alkylierungsmittel der allgemeinen Formel V,

15

R—Z (V)

worin R Alkyl mit 1 bis 30 C-Atomen ist und Z für eine nukleophile Abgangsgruppe steht, umsetzt und gewünschtenfalls Schutzgruppen abtrennt.

20

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Alkylierungsmittel (V) verwendet, worin Z Brom oder vorzugsweise Jod ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Alkylierungsmittel verwendet in dem R Alkyl mit 2 bis 8 C-Atomen ist, vorzugsweise Ethyl ist.

25

23. Verwendung eines Oligonukleotides nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Antisense-Oligonukleotid, Sonde, Primer oder Primerabschnitt.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

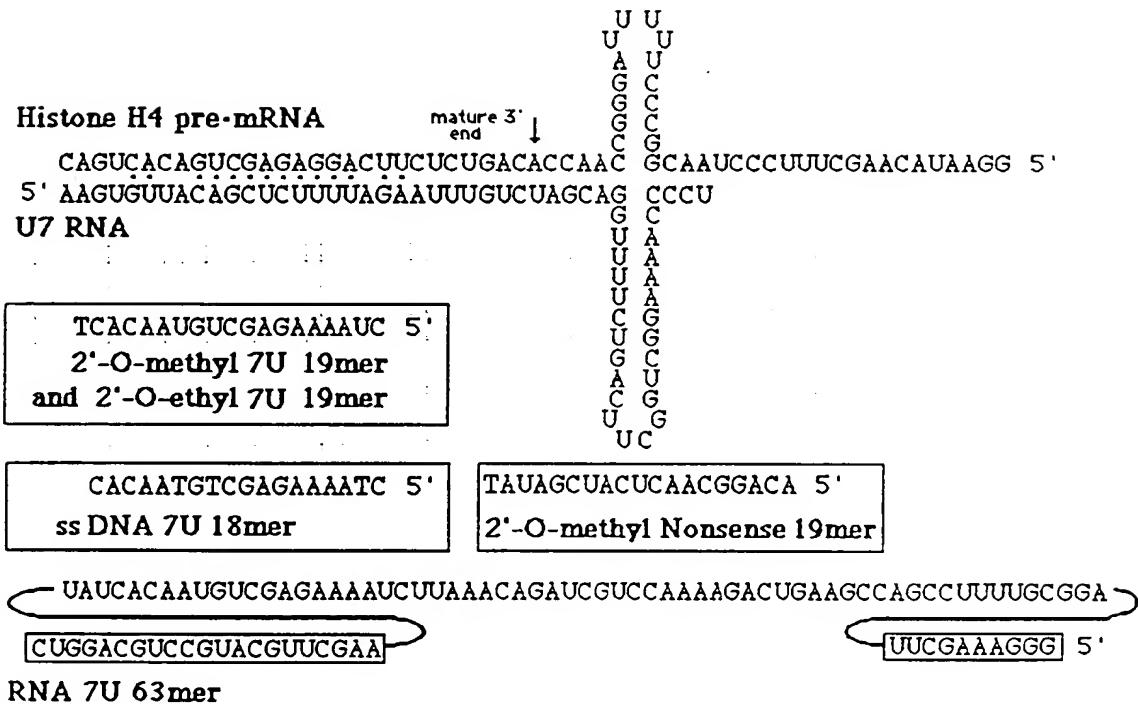


Fig. 1

Nummer:

DE 41 10 085 A1

Int. Cl. 5:

C 07 H 19/20

Offenlegungstag:

1. Oktober 1992

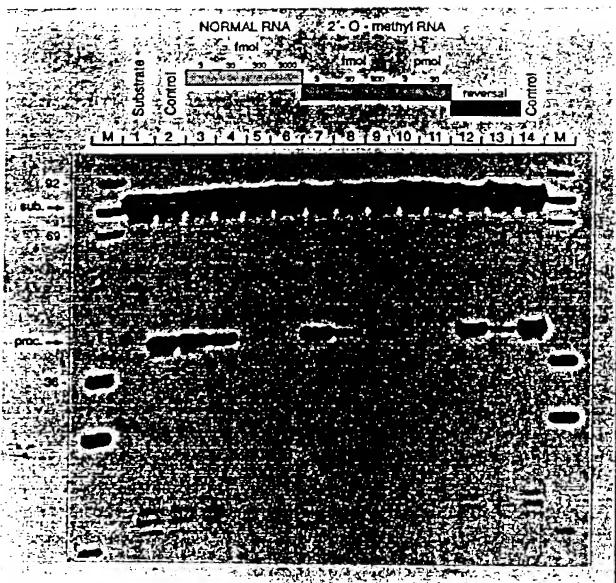


fig. 3 ↑

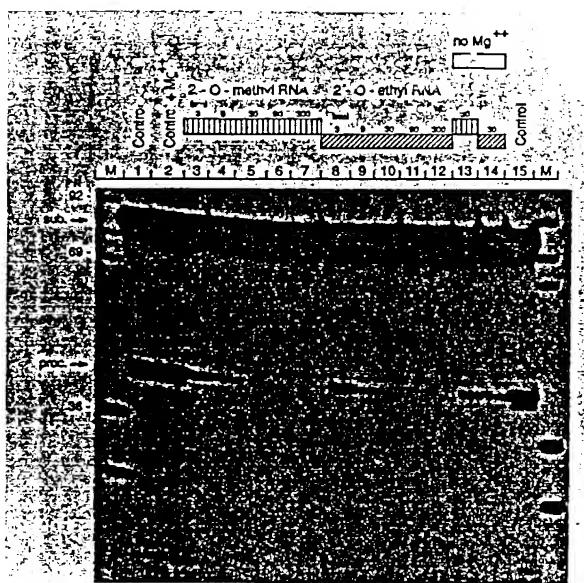


fig. 6 ↑

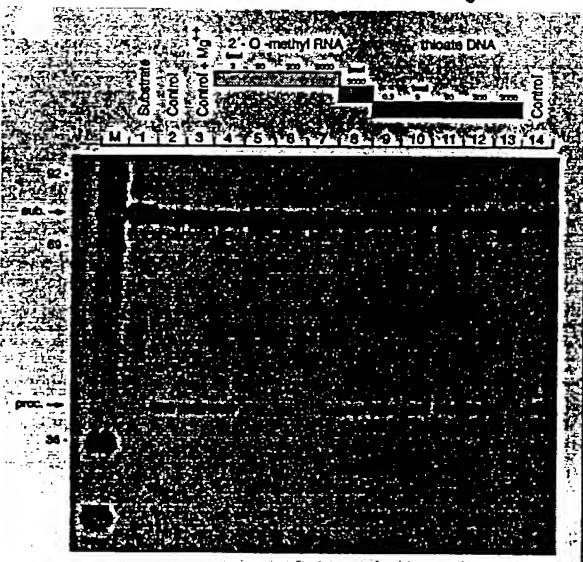


fig. 4 ↑

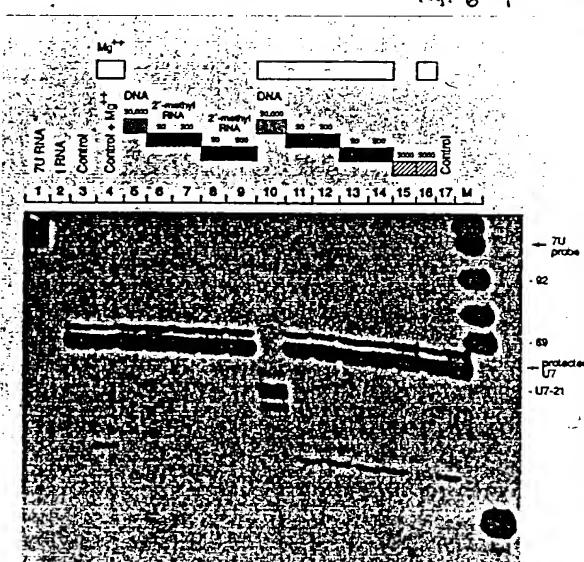


fig. 7 ↑

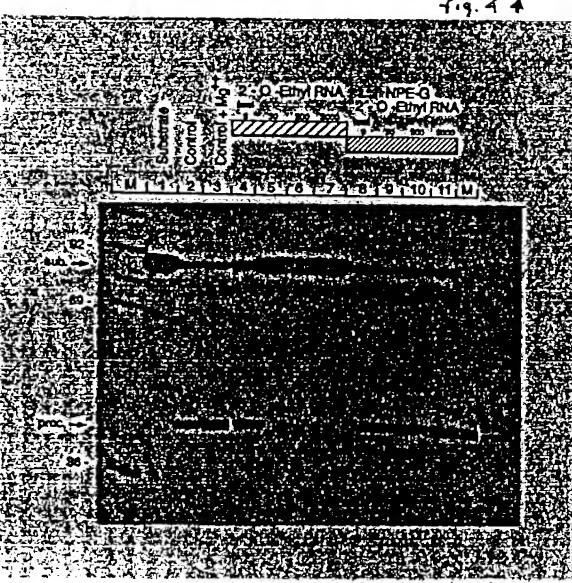


fig. 5 ↑

Fig. 3 - 7 }]

C-18 reverse-phase HPLC

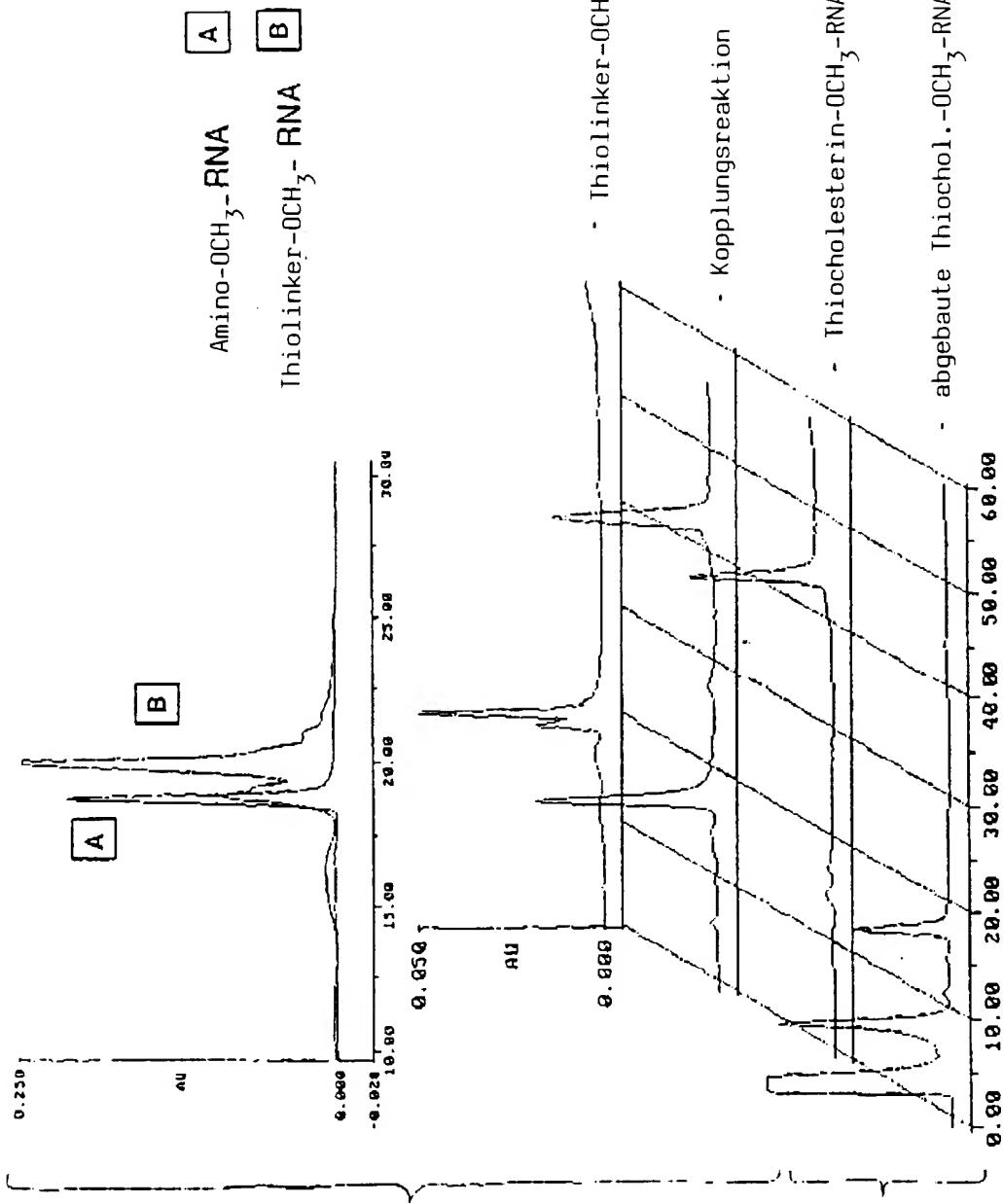


Fig. A1

Fig. A2

Fig. A1 und A2

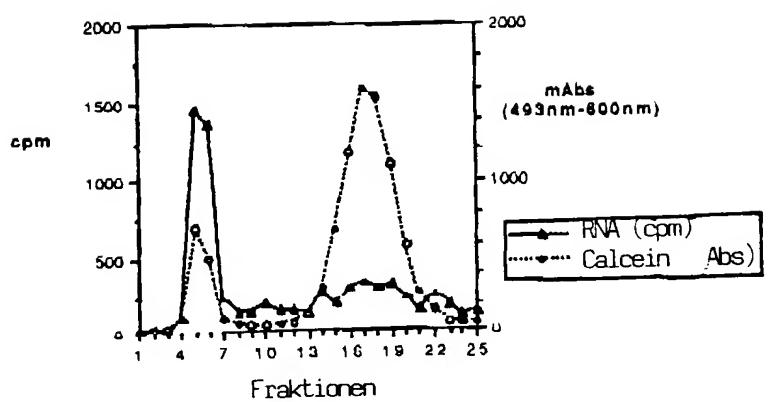


Fig. A3:

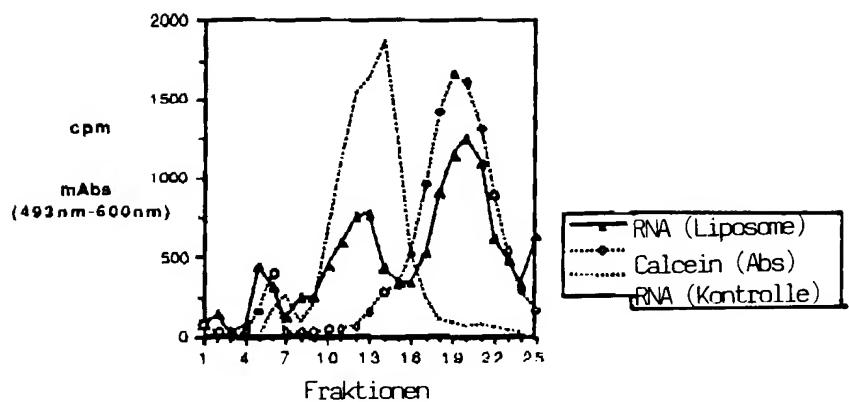


Fig. A4:

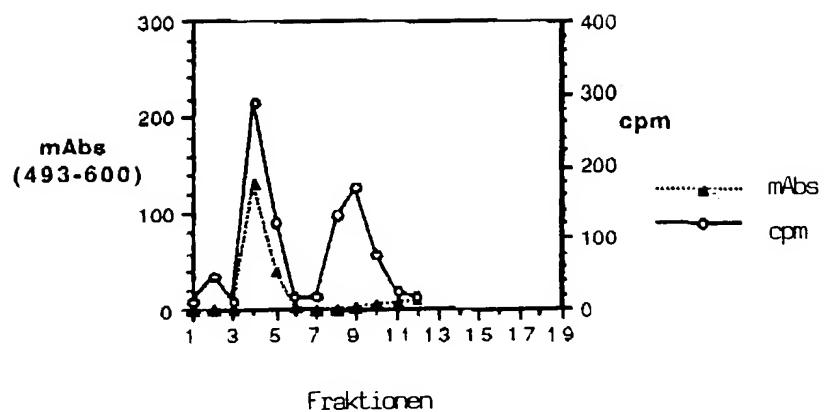


Fig. A5:

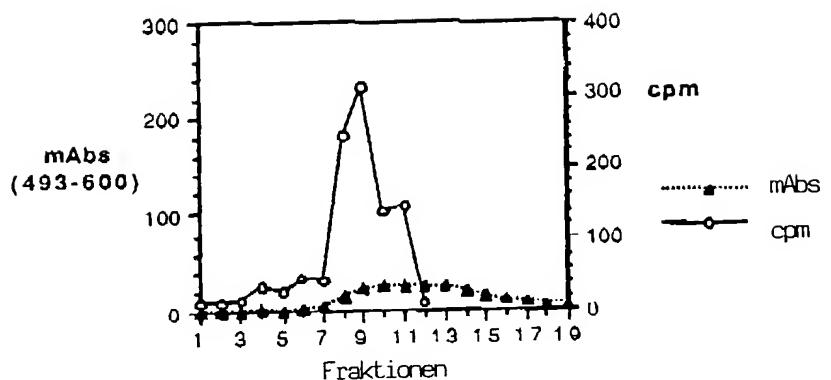


Fig. A6: